

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Postgrado



Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al grado académico de Doctorado en Ciencias Biomédicas

“Señalización autocrina de adenosina producida por CD73 en
células T CD8+”

Alumno: Elizabeth Rivas Yáñez

Directores: Dra. Daniela Sauma

Dra. María Rosa Bono

Fecha: 10 de Septiembre 2021

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina,
que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas presentada por el candidato**

ELIZABETH RIVAS YÁÑEZ

**ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar
al Grado de Doctor en Ciencias Biomédicas en Examen de Defensa de Tesis rendido
el día 11 de agosto de 2021.**

**Prof. Dra. Daniela Sauma
Prof. Dra. Maria Rosa Bono
Director de Tesis
Facultad de Ciencias, Universidad de Chile**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

PROF. DRA. LISETTE LEYTON

PROF. DR. ALVARO LLADSER

PROF. DR. LEANDRO CARREÑO

**PROF. DR. MAURICIO HENRIQUEZ
Presidente Comisión de Examen**

DEDICATORIA

Esta tesis esta dedicada a mis padres, Mónica Yáñez y José Rivas, quienes con su apoyo incondicional me ayudan a terminar este largo proceso que fue el Doctorado. Mi madre se fue de este plano durante la realización de mi tesis, pero sigue conmigo todos los días apoyándome para que no rinda en cumplir mis sueños y mi padre que me apoya en todo lo que emprendo con sus consejos y amor.

Finalmente dedicarla a mi hermano, mi sobrina y mi cuñada por la alegría y amor que me entregan siempre y a mi compañera perruna que soporto mis días enteros de encierro por estudiar.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer con el corazón a mi tutora de tesis por creer en mí y apoyarme en un momento muy complicado para terminar este largo proceso, la Dra. Daniela Sauma. Sin su apoyo no sería posible este trabajo. Agradecer a la mi co-tutora la Dra. María Rosa Bono, que me abrió las puertas al laboratorio y me entregó su apoyo y confianza.

Agradecer a mis compañeros de laboratorios, por el apoyo, los consejos, las ayudas y las risas durante mi estadía en el laboratorio. Bian, Pedro, Justine, Daphne y Nicolas fueron grandes compañeros y aunque mi estadía en el laboratorio de inmunología fue interrumpida por la pandemia, seguimos con el contacto y el apoyo mutuo.

Agradecer a Valeska y Leonardo por su apoyo durante los largos días adquiriendo muestras. Valeska me abrió las puertas de hogar en pandemia para poder continuar con mi trabajo, por lo que estoy muy agradecida.

Finalmente agradecer al programa de Doctorado por la oportunidad y a su secretaria Cecilia Carter que es el corazón y la fuerza del programa, sin ella muchos quedaríamos perdidos en el proceso.

INDICE

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
INDICE.....	v
Indice de figuras	vii
Lista de abreviatura.....	viii
Resumen.....	1
Abstract	3
1. Introducción	5
1.1. Diferenciación de los linfocitos T CD8+	5
1.2. Señalización purinérgica en el sistema inmune	8
1.3. Señalización adenosinérgica en células T.....	11
1.4. Inmunosupresión mediada por Adenosina	12
2. Hipótesis.....	15
3. Objetivo General	15
4. Objetivos Específicos.....	15
5. Materiales y Métodos	16
5.1. Materiales	16
5.1.1. ANTICUERPOS, CITOQUINAS Y KITS	16
5.1.2. RATONES	17
5.2. Métodos	17
5.2.1. Aislamiento de células de bazo y linfonodo.....	17
5.2.2. Cell sorting de linfocitos T CD8+ vírgenes	18
5.2.3. Activación de células T CD8+ <i>in vitro</i>	18
5.2.3. Activación de células T CD8+ <i>in vivo</i>	19
5.2.4. Evaluación de moléculas de superficie por citometría de flujo	19
5.2.5. Evaluación de células productoras de citoquinas por citometría de flujo	20
5.2.6. Ensayo de producción de adenosina.....	21
5.2.7. Evaluación de receptor de adenosina A2A por citometría de flujo	21
5.2.8. Evaluación de marcadores de citotoxicidad por citometría de flujo	22
5.2.9. PCR cuantitativo en tiempo real	23
5.2.10 Análisis Estadístico	23

6.	Resultados	25
6.1.	AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE CD73 Y CD39 DURANTE LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD8+ <i>IN VITRO</i>	25
6.2.	PRODUCCIÓN DE ADENOSINA EN CÉLULAS T CD8+	30
6.3.	AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE CD73 EN LINFOCITOS T CD8+ DURANTE LA RESPUESTA INMUNE <i>IN VIVO</i>	31
6.4.	EXPRESIÓN DE A2AR EN LOS LINFOCITOS T CD8+ ACTIVADOS <i>IN VITRO</i>	36
6.5.	CD73 INHIBE LA EXPRESIÓN DE CD25 EN LAS CÉLULAS CD8+	38
6.6.	CD73 AFECTA LA EXPRESIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN RELACIONADOS AL PROGRAMA EFECTOR DE CÉLULAS CD8+	40
6.7.	CD73 REDUCE LA PRODUCCIÓN DE GRANZIMA B Y CITOQUINAS INFLAMATORIAS EN CÉLULAS T CD8+	42
7.	Discusión	46
8.	Conclusiones.....	55
9.	Bibliografía	56

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Componentes de la señalización purinérgica	10
Figura 2. Modelo propuesto de señalización de adenosina producida por CD73 en células T CD8+.....	12
Figura 3. CD73 aumenta su expresión durante la activación <i>in vitro</i> de linfocitos T CD8 ...	27
Figura 4. Expresión de CD73 y CD39 durante la proliferación celular.....	29
Figura 5. Producción de adenosina por las células CD8+.....	31
Figura 6. Respuesta inmune in vivo de células CD8+ luego de la inmunización con OVA+LPS	33
Figura 7. Cinética de expresión de ectonucleotidasas CD73 y CD39 durante la activación in vivo de las células CD8+/CD44+/CD62L-.....	34
Figura 8. Cinética de expresión de ectonucleotidasas CD73 y CD39 durante la activación in vivo de las células CD8+/CD44+/CD62L+.....	35
Figura 9. Expresión del receptor de adenosina A2AR en células T CD8+ activadas <i>in vitro</i> por 3 días	38
Figura 10. CD73 reduce la expresión de CD25 en células T CD8+ activadas in vitro.	39
Figura 11. Evaluación de factores de transcripción maestros en linfocitos T CD8+ WT y CD73KO activados	41
Figura 12. CD73 reduce la producción de granzima B y citoquinas inflamatorias en células T CD8+.	44

LISTA DE ABREVIATURA

- cAMP: Adenosín monofosfato cíclico
- ADP: Adenosín difosfato
- AMP: Adenosín monofosfato
- ATP: Adenosín trifosfato
- APC: célula presentadora de antígeno
- APCP: adenosin 5'-(α , β -metileno) difosfato
- Blimp-1: *PR domain zinc finger protein 1*
- CTL: linfocito T citotóxico (*cytotoxic T cell*)
- CTV: *Cell Trace Violet*
- DAMP: *Damage-associated molecular pattern*
- Eomes: eomesodermina
- FACS: *Fluorescence-activated cell sorting*
- IFN- γ : Interferón gama
- IL-2: Interleuquina 2
- I.V: inyección intravenosa
- KLRG1: *Killer cell lectin-like receptor G1*
- LAG-3: *Lymphocyte-activation gene 3*
- Lef-1: *lymphoid enhancer binding factor 1*
- MFI: Intensidad media de fluorescencia (*mean fluorescence intensity*)
- MHC: complejo principal de histocompatibilidad
- MPEC: Célula efectora precursora de memoria (*Memory Precursor effector cell*)
- NK: *Natural Killer*
- OVA: ovoalbúmina

- PBS: *Phosphate Buffered Saline*
- PD-1: *Programmed death 1 molecule*
- PKA: proteína quinasa A (*protein kinase A*)
- PLN: linfonodo periférico (*Peripheral Lymph node*)
- PMA: *Phorbol 12-myristate 13-acetate*
- RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*
- SFB: suero fetal bovino
- SLEC: Célula efectora de vida corta (*Short-Lived effector cell*)
- T-bet: *T-box transcription factor TBX21*
- Tc1: T citotóxico tipo 1 (*Type 1 CD8+ T cell*)
- Tcf-7: *transcription factor 7*
- Tcm: Células T de memoria central (*Central Memory T cell*)
- TCR: receptor de células T (*T cell receptor*)
- Tem: Célula T de memoria efectora (*Effector Memory T cell*)
- Tm: Célula T de memoria (*Memory T cell*)
- Tn: Célula T virgen (*naïve T cell*)
- Trm: célula residente de memoria
- TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
- Treg: Células T reguladoras
- UDP: Uridina Difosfato
- UTP: Uridina Trifosfato

RESUMEN

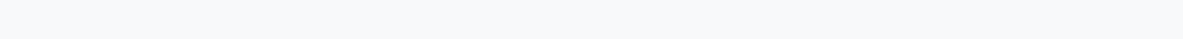
El reconocimiento antigénico gatilla en el linfocito T CD8+ virgen varias cascadas de señalización intracelular, las cuales promueven su activación y diferenciación en linfocitos T citotóxicos o de memoria. Los linfocitos T citotóxicos cumplen un rol esencial en la eliminación de células tumorales y células infectadas a través de múltiples mecanismos efectores, los cuales incluyen la producción de granzima B, perforina y citoquinas proinflamatorias. Se ha reportado que la función efectora de los linfocitos T CD8+ es inhibida por acción de la adenosina, la cual se une a receptores A2A presentes en estos linfocitos. La adenosina extracelular es producida principalmente mediante la hidrólisis de ATP por acción de las ectonucleotidasas CD39 y CD73, siendo CD73 la enzima que cataliza la etapa final de la hidrólisis de AMP a adenosina. En nuestro laboratorio, hemos demostrado que CD73 se expresa en linfocitos T CD8+ vírgenes y de memoria, sin embargo, aún se desconoce la función que cumpliría esta ectonucleotidasa durante la activación linfocitaria. En base a estos antecedentes, postulamos que la señalización autocrina de adenosina producida por CD73 controla las vías de señalización provocando una reducción en la activación de los linfocitos T CD8+ vírgenes y su diferenciación en células citotóxicas. Para esto evaluamos la cinética de expresión de los componentes moleculares de la señalización adenosinérgica en células T CD8+ luego de su activación. A continuación, buscamos demostrar el papel de CD73 en la señalización mediada por adenosina y en la función citotóxica de los linfocitos T CD8+. Nuestros resultados demuestran que los linfocitos T CD8+ producen adenosina y poseen los componentes necesarios para la

señalización adenosinérgica, entre los cuales se encuentra CD39, CD73 y el receptor A2A de adenosina. Más aún, mediante experimentos *in vitro* e *in vivo* demostramos que la activación de los linfocitos T CD8+ induce la expresión de estos componentes en las células que presentan un perfil efector. Finalmente, a través de la utilización de un modelo murino *knockout* para CD73, demostramos que esta ectonucleotidasa reduce la activación, el programa efector y la capacidad citotóxica de los linfocitos T CD8+. Nuestros datos sugieren que CD73 es un punto de control inmune en la activación y diferenciación de los linfocitos T citotóxicos. Así, CD73 emerge como un nuevo blanco terapéutico de manera de mejorar el potencial citotóxico de los linfocitos T CD8+ y así potenciar las terapias antitumorales existentes.

ABSTRACT

Antigen recognition by naive CD8⁺ T lymphocytes triggers several intracellular signaling cascades, which promote their activation and differentiation into cytotoxic or memory T cells. Cytotoxic T lymphocytes play an essential role in the elimination of tumoral and infected cells through various effector mechanisms, which include the production of granzyme B, perforin, and pro-inflammatory cytokines. It has been reported that the effector function of CD8⁺ T cells is inhibited by adenosine through the engagement of A2A receptors on T cells. Extracellular adenosine is produced mainly through ATP hydrolysis by the tandem action of CD39 and CD73 ectonucleotidases, being CD73 the enzyme that catalyzes the final stage of AMP hydrolysis to adenosine. In our laboratory, we have shown that CD73 is expressed in naive and memory CD8⁺ T cells, however the role that this ectonucleotidase plays on T cell activation is still unknown. Based on these findings, we postulate that autocrine adenosine signaling produced by CD73 controls signaling pathways causing a reduction in the activation of naive CD8⁺ T lymphocytes and their differentiation into cytotoxic cells. To test this hypothesis, we analyzed the expression of the molecular components of the adenosinergic signaling in CD8⁺ T cells during their activation. Next, we evaluated the role of CD73 in adenosine signaling and the cytotoxic function of CD8⁺ T lymphocytes. Our results show that CD8⁺ T lymphocytes produce adenosine and possess the main components for adenosinergic signaling, including CD39, CD73 and the adenosine A2A receptor. Furthermore, through *in vitro* and *in vivo* experiments we demonstrated that the activation of CD8⁺ T lymphocytes induces the expression of these components in cells

with an effector profile. Finally, using a knockout model for CD73, we demonstrate that this ectonucleotidase reduces the activation, effector program and cytotoxic capacity of CD8+ T cell. Our results suggest that CD73 is an immune checkpoint in the activation and differentiation of cytotoxic T lymphocytes. Thus, CD73 emerges as a new therapeutic target to improve the cytotoxic potential of CD8 + T lymphocytes and thus enhance existing antitumor therapies.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Diferenciación de los linfocitos T CD8+

Los linfocitos T CD8⁺ son células altamente especializadas en la eliminación de células tumorales y células infectadas con patógenos intracelulares como virus, bacterias y protozoos. Debido a estas características, estos linfocitos se han estudiado para ser utilizados en inmunoterapias contra el cáncer (Dudley et al., 2008; Hinrichs et al., 2009; Zhao et al., 2009) y contra infecciones virales (Barber et al., 2006; Cartwright et al., 2016), por lo que se ha vuelto relevante conocer los estímulos que influyen en la generación de linfocitos T CD8⁺ activos y funcionales.

Los linfocitos T vírgenes circulan por el cuerpo en estado de reposo hasta que se activan en los órganos linfoides, bazo o tejidos linfoides asociados a mucosas. En estos órganos, los linfocitos T vírgenes se encuentran con células presentadoras de antígenos (APC) que presentan antígenos en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC). El contacto específico entre el receptor de linfocitos T (TCR) en las células T y el complejo MHC-péptido inicia el reconocimiento del antígeno a través de su receptor clonotípico y en conjunto con señales de co-estimulación y citoquinas inflamatorias provoca la activación de las células T (Kaech and Cui, 2012). La activación del TCR induce una cascada de señalización intracelular que lleva a la fosforilación de sus motivos de activación inmunorreceptores basado en tirosina (ITAM) por la tirosina quinasa Lck. Esto permite reclutar a la proteína quinasa asociada a cadena zeta (ZAP-70) que también es activada y fosforila a otras moléculas de señalización como LAT, SLP-76 entre otras (Rossy et al., 2012; Hwang et al.,

2020). Luego varias vías de señalización pueden ser desencadenadas, como la activación de la enzima fosfolipasa C (PLC-1), la activación de la vía de las MAP quinasas y la activación de la PI3 quinasa (PI3K), lo que permite la activación de los factores de transcripción que inducen genes de citoquinas y otras proteínas efectoras (Hwang et al., 2020).

Una vez activadas, las células T CD8+ experimentan la expansión clonal y la diferenciación terminal hacia células efectoras citotóxicas de vida corta (SLECs por *short lived effector cells*) o a células efectoras precursoras de memoria (MPECs por *memory precursor effector cells*). Su citotoxicidad es mediada por la liberación de moléculas como granzima B GzmB y perforina, las cuales actúan directamente sobre la célula blanco y citoquinas inflamatorias como interferón gama (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Hamann et al., 1997; Bono et al., 2007; Kaech and Cui, 2012).

Luego de la eliminación del patógeno, la mayoría de los linfocitos T efectoras muere y solo una pequeña población de células permanece como células T específicas de memoria contra el antígeno (5-10% aproximadamente). Las células de memoria presentan una alta capacidad de proliferación, sobrevivida y una baja citotoxicidad, pero pueden diferenciarse a una población efectora, luego de ser estimuladas con el mismo antígeno. Así, se distinguen 3 poblaciones de células T CD8+ de memoria; células T de memoria central (T_{CM}) que migran a los tejidos linfoides secundarios y la sangre; células T de memoria efectoras (T_{EM}) que se ubican en los tejidos periféricos, sangre y bazo (Sallusto et al., 1999); y células T de memoria residentes de tejido (T_{RM}) que residen en el cerebro y en las mucosas. Las células T_{CM} presentan un perfil migratorio similar a las células T vírgenes, debido a la expresión de

CD62L y CCR7, moléculas involucradas en la residencia en linfonodos secundarios (Hamann et al., 1997; Bono et al., 2007; Kaech and Cui, 2012).

La diferenciación de las células T CD8+ es un proceso complejo que involucra numerosas vías de señalización intercomunicadas. Mientras ocurre la activación, los linfocitos T transitan a través de una progresiva diferenciación desde células vírgenes hacia células efectoras, proceso en el cual pierden su potencial proliferativo y de supervivencia, pero adquieren moléculas citotóxicas, cambian su patrón migratorio y adquieren finalmente la expresión de proteínas asociadas a senescencia (ej. KLRG1) (Remmerswaal et al., 2019). Los factores de transcripción que regulan los programas génicos de células efectoras y de memoria, funcionan en pares como Eomes/T-bet, Bcl-6/Blimp-1, ID3/ID2, y STAT3/STAT4, siendo los primeros (Eomes, Bcl-6, ID3 y STAT3) involucrados en la diferenciación de células de memoria y los últimos (T-bet, Blimp-1, ID2 y STAT4) en la diferenciación a células efectoras.

El modelo más aceptado actualmente de diferenciación celular propone que el programa efector y de memoria dependen de la fuerza de señalización a través del complejo molecular del TCR, siendo una fuerte señalización a través del TCR inductora del fenotipo efector, mientras el fenotipo de memoria sería una consecuencia de una señalización más débil (Chang et al., 2014). Luego, las células activadas sufren un aumento de proliferación y de biomasa, donde incrementan su número de 100 a 10.000 veces, lo que es acompañado con un cambio en el metabolismo o switch metabólico, la generación de energía y la producción de biomoléculas (Gerlach et al., 2010; Chang et al., 2014). Entender los factores

que controlan la diferenciación de las células T CD8+ hacia linfocitos efectores y de memoria, puede mejorar las terapias contra el cáncer que se basan en una mayor efectividad de la actividad citotóxica antitumoral.

1.2. Señalización purinérgica en el sistema inmune

La vía de señalización purinérgica es una vía altamente conservada que regula varios aspectos críticos de la respuesta inmune. La señalización purinérgica está mediada por nucleótidos de purina y nucleósidos como adenosín trifosfato (ATP), adenosina y diferentes receptores que se expresan ampliamente en las células inmunes (Eltzschig et al., 2012). En condiciones homeostáticas, el ATP extracelular (eATP) se encuentra en muy bajas concentraciones (en el rango nM). Durante el proceso inflamatorio y en condiciones de lisis celular, apoptosis o estrés celular, se provoca la liberación de ATP, ADP y otros nucleótidos en el espacio extracelular, llegando a concentraciones micromolares (Bours et al., 2006). El ATP liberado durante el daño tisular representa una potente "señal de peligro" o patrón molecular asociado al daño (DAMP) que tiene efectos quimiotácticos y excitadores en las células inmunes provocando una respuesta proinflamatoria (Di Virgilio and Vuerich, 2015; Cekic and Linden, 2016). El ATP también puede liberarse durante la activación de las células T a través de canales de pannexina-1, participando en un circuito de retroalimentación positiva que promueve la activación de las células T (Schenk et al., 2008).

El ATP liberado al medio extracelular se une a los receptores purinérgicos P2, induciendo respuestas inmunes proinflamatorias. El eATP se encuentra en bajas concentraciones en los tejidos sanos, entre 10 -100 nM, y las células inmunes son muy

sensibles a pequeñas variaciones en su concentración. Además, el eATP se degrada rápidamente y se une a receptores de membrana específicos (Pellegatti et al., 2008; Di Virgilio and Adinolfi, 2017; Morciano et al., 2017). Se distinguen 2 tipos de receptores P2 según sus propiedades estructurales; P2Y y P2X. Los P2YR son receptores acoplados a proteína G que son activados por ATP, ADP, trifosfato de uridina (UTP), uridina difosfato (UDP) y UDP-glucosa. Los receptores P2X son canales de cationes selectivos permeables a Na⁺, K⁺ o Ca⁺² y activados por ligandos (Di Virgilio et al., 2018). El P2X7R se destaca dentro de los receptores de ATP, ya que presenta baja afinidad por ATP (EC₅₀>100μm), por lo que se activa durante la inflamación cuando los niveles de ATP son muy altos. En concentraciones bajas de ATP, P2X7R puede funcionar como un canal iónico, mientras que en concentraciones más altas de ATP o después de una señalización sostenida de ATP, P2X7R puede formar un gran poro que conduce a la apoptosis (Junger, 2011; Rivas-Yáñez et al., 2020).

Con el tiempo, los nucleótidos extracelulares se metabolizan a adenosina, lo que conduce a una señalización reducida de receptores de tipo P2 y una señalización aumentada a través de receptores de adenosina o P1. Esta disminución en la relación de ATP/adenosina, provoca una reducción de la señalización de ATP y un aumento de la activación de los receptores de adenosina (A2A y A2B), lo que sirve para limitar la extensión y duración de la inflamación (Cekic and Linden, 2016). La adenosina se produce de forma constitutiva como resultado de procesos metabólicos y aumenta en respuesta a la hipoxia celular y al estrés celular, siendo capaz de atravesar la membrana celular (Yao et al., 2011). La adenosina extracelular se produce también, a partir de la degradación de ATP y ADP por exonucleasas.

Así, la adenosina está disponible en todos los tejidos y órganos y cambia de concentración según el tipo de tejido y las condiciones fisiológicas (Cekic et al., 2013).

Las principales enzimas que hidrolizan el ATP y que se encuentran presentes en las células inmunes son la ectonucleotidasa CD39 (NTPDase-1) que cataliza la conversión de ATP a AMP (Robson et al., 2006), y la ectonucleotidasa CD73, que cataliza la desfosforilización de AMP a adenosina (Regateiro et al., 2013). Estas enzimas se han considerado fundamentales en la regulación de la inmunidad y la inflamación.

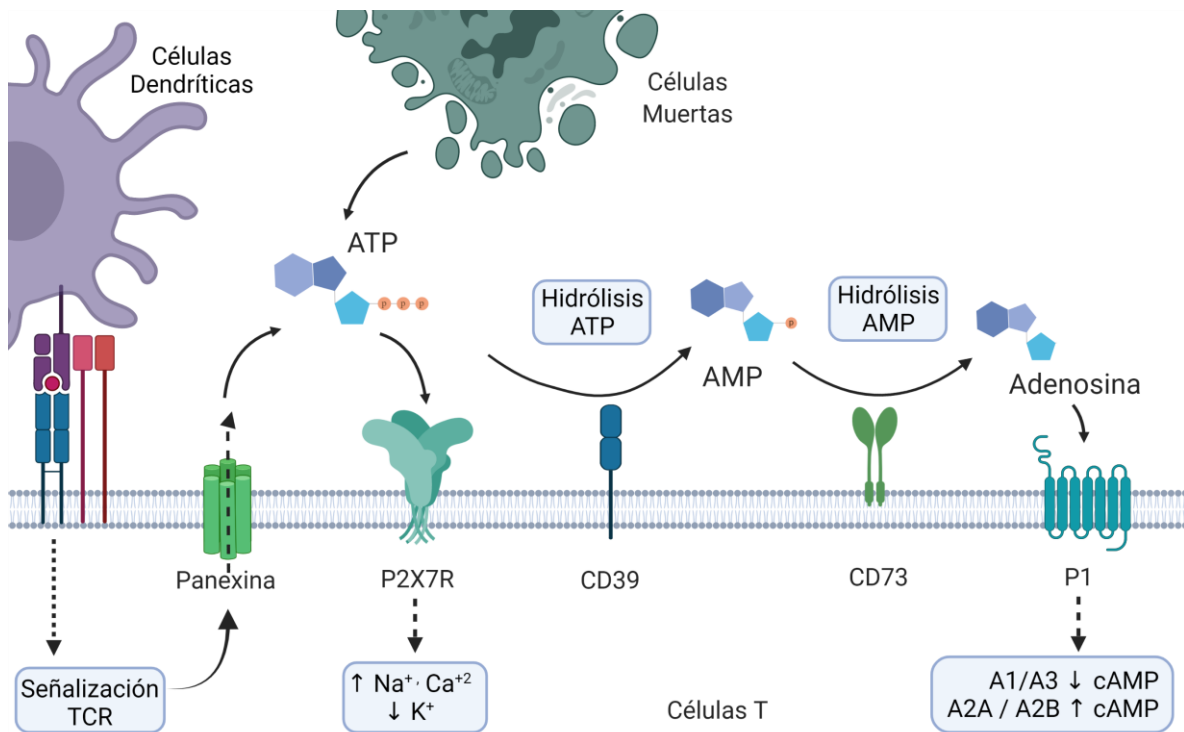


Figura 1. Componentes de la señalización purinérgica. Los elementos clave de la señalización purinérgica comprenden: la liberación de ATP de las células inmunes en respuesta a la activación mediante la apertura de hemicanales de panexina 1 (panx1) y el ATP liberado por células muertas, la activación autocrina de los receptores P2, la hidrólisis de ATP y formación de adenosina por ectonucleotidasas, y la activación de los receptores P1. La señalización purinérgica autocrina permite la estimulación localizada porque puede limitarse a regiones específicas y adaptarse a requisitos funcionales específicos. Además, a estos procesos autocrinos se pueden sumar procesos paracrinos que son generados por otras células o tejidos infectados o dañados. Adaptado de Rivas-Yáñez et al., 2020.

1.3. Señalización adenosinérgica en células T

La señalización de la adenosina es mediada por receptores acoplados a proteína G: A1, A2A, A2B y A3. Los receptores A1 y A3 están acoplados a subunidad Gi/o, por lo que su estimulación inhibe la adenilato ciclasa, disminuyendo los niveles de cAMP. Mientras que A2A y A2B están acoplados a la subunidad Gs que estimula la producción de cAMP (Allard et al., 2012). En células T el receptor predominante es A2A y su expresión se induce luego de la activación (Lappas et al., 2005; Antonioli et al., 2013). La estimulación a través de A2A está relacionada con efectos supresores en células T, células dendríticas, neutrófilos, macrófagos y otras células inmunes (Stagg and Smyth, 2010).

La activación de la vía de señalización adenosinérgica a través de A2AR promueve un aumento del cAMP intracelular (Linnemann et al., 2009) que lleva a la inhibición de las vías de señalización de activación de las células T (Cekic et al., 2013). El cAMP inhibe enzimas como PI3 quinasa (PI3K) lo que provoca la inhibición de la actividad de Akt (Kim and Suresh, 2013) la cual es esencial para la proliferación celular y activación de células T (Cekic et al., 2013). Además, el aumento de cAMP provoca la activación de la enzima quinasa PKA (Allard et al., 2012; Cekic et al., 2013) que inhibe la fosforilación de la quinasa ZAP-70 interfiriendo con la señalización del TCR (Linnemann et al., 2009). Así, se ha propuesto que la inhibición de la activación del TCR mediante adenosina ocurriría a través de la acumulación de moléculas derivadas de daño tisular, como ATP o adenosina (Sitkovsky et al., 2004), para prevenir un daño mayor tisular por sobre activación del sistema inmune.

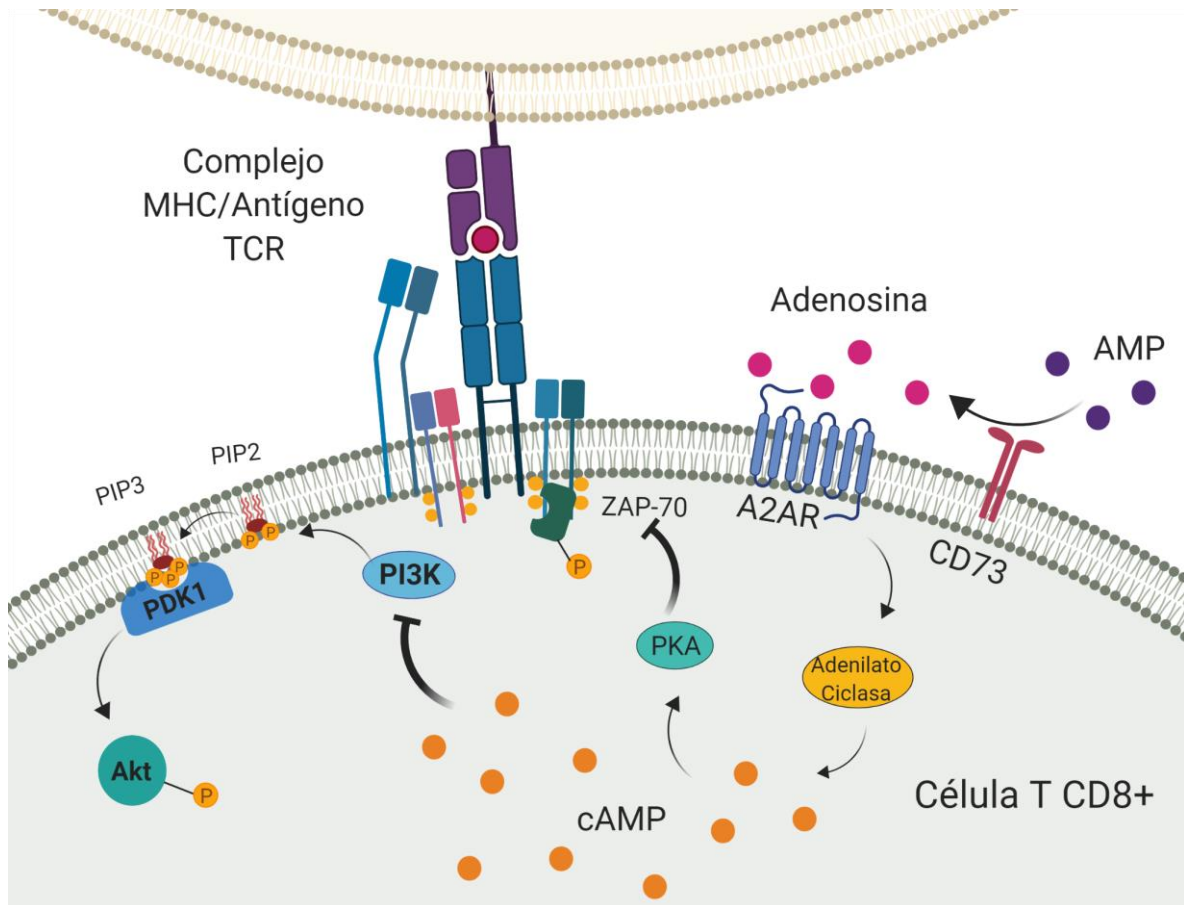


Figura 2. Modelo propuesto de señalización de adenosina producida por CD73 en células T CD8+. El modelo propuesto comprende los siguientes eventos (1) Adenosina extracelular producida por CD73 se une a su receptor A2A. (2) Aumento del cAMP intracelular inhibe PI3K y la vía de activación de Akt. (3) El aumento de cAMP activa la enzima PKA, la que inhibe la fosforilación de ZAP-70 y con ello todas las vías río abajo, como la activación de PLC, Ca²⁺, PKC y MAPKs. La señalización adenosinergica controla la señalización del receptor de células T (TCR) y, por lo tanto, controla la activación y diferenciación de células T CD8 vírgenes.

1.4. Inmunosupresión mediada por Adenosina

Como ha sido mencionado con anterioridad, la adenosina extracelular es producida principalmente a través de la hidrólisis de ATP por acción de las ectonucleotidasas CD39 y CD73, por lo tanto, la expresión de estas enzimas determina en gran medida la capacidad de la célula de producir adenosina. Se ha descrito que varias células del sistema inmune

como linfocitos B, monocitos, células dendríticas, células *natural killer* (NK) y linfocitos T CD4+, expresan CD39 y CD73 (Resta et al., 1998; Allard et al., 2017). En nuestro laboratorio, hemos demostrado que CD73 se expresa en linfocitos T CD8+ vírgenes y su expresión se encuentra reducida en células con un fenotipo efector (Flores-Santibáñez et al., 2015).

Existen varios reportes del efecto de adenosina sobre los linfocitos T CD4+, pero sin información sobre su efecto en células T CD8+. Se ha demostrado que la adenosina extracelular previene la proliferación, activación, expansión clonal y producción de citoquinas en este subset de células T CD4+ (Huang et al., 1997; Deaglio et al., 2007; Ohta et al., 2009). Además, la estimulación del receptor A2A inhibe la diferenciación de células Th1 y Th2, ya que disminuye la proliferación y la producción de IL-2 en las células T vírgenes. En las células efectoras Th1 y Th2, la activación del receptor A2A disminuye la secreción de citoquinas inflamatorias (Csóka et al., 2008). Además, se ha reportado que la adenosina también promueve la generación de células T reguladoras Foxp3+ (Treg) y reduce la diferenciación de células Th17 al inducir un aumento de TGF- β y una disminución de la producción de IL-6 por esplenocitos (Zarek et al., 2008). Otros trabajos han demostrado que la estimulación del receptor A2A promueve la expansión de células Treg con una gran actividad inmunoregulatoria (Ohta et al., 2012), demostrando el efecto inhibitorio de adenosina y su señalización en la activación de linfocitos T CD4+.

En resumen, el conjunto de antecedentes permite establecer qué; 1) la señalización purinérgica participa en la activación de las células CD8+; 2) la adenosina inhibe la activación de los linfocitos; 3) CD73 es la principal fuente de adenosina extracelular y nuestro grupo

ha demostrado que se encuentra presente en las células T CD8+, por lo que postulamos que: La señalización autocrina de adenosina producida por CD73 reduce la activación de los linfocitos T CD8+ y su diferenciación en células citotóxicas.

2. HIPÓTESIS

La señalización autocrina de adenosina producida por CD73, reduce la activación de células T CD8+ y su diferenciación a células citotóxicas.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la señalización autocrina de adenosina producida por CD73, inhibe la activación de células T CD8+ y su función efectora.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar la cinética de expresión de los componentes moleculares de la señalización adenosinérgica en células T CD8+ durante su activación.
2. Demostrar el papel de CD73 en la señalización adenosinérgica durante la activación de las células T CD8+.
3. Estudiar el papel de CD73 en el fenotipo efector de los linfocitos T CD8+.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

5.1.1. ANTICUERPOS, CITOQUINAS Y KITS

Los anticuerpos (anti-ratón) contra CD8a FITC (clon 53-6.7), CD8a Brilliant violet 421 (clon 53-6.7), CD8a PerCP-Cy5.5 (clon 53-6.7), CD44 APC (clon IM7), CD44 BV785 (clon IM7), CD62L PECy7 (MEL-14), CD73 APC (clon TY/11.8), CD39 PE (clon Duha59), TNF- α FITC (clon MP6-XT22), Granzima B Alexa Fluor 647 (clon GB11) y los anticuerpos activadores α CD3 (clon 145-2C11) y α CD28 (clon 37.51), fueron obtenidos en Biolegend. Mientras que los anticuerpos (anti-ratón) contra CD8a PECy7 (clon 53-6.7), CD25 PE (clon PC61.5), CD25 APC (clon PC61.5), CD62L FITC (clon MEL-14), CD73 PerCP efluor 710 (clon eBioTY/11.8), CD54.2 BV510 (clon 104), IL-2 PECy7 (clon JES6-5H4), IFN- γ eFluor 660 (clon XMG1.2) fueron obtenidos en eBioscience. El anticuerpo α -A2AR (clon NBP1-39474APC) fue obtenido en Novus Biological.

Además, se utilizaron los siguientes reactivos y kits; Proteína OVA (Sigma), Péptido OVA 257-264 (Sigma-Aldrich), CTV (Cell Trace Violet, Invitrogen), Viability Dye (Biolegend), IL-2 recombinante murina (Biolegend), MojoSort mouse CD8 T cell isolation Kit (Biolegend). El inhibidor de CD73, APCP [adenosina 5'-(α,β -metileno) difosfato] se utilizó a una concentración de 50 μ M (Sigma-Aldrich) para los cultivos. APCP presenta un IC₅₀ de 3,8 \pm 0,9 μ M cuando es medido con la forma recombinante purificada de CD73 (forma soluble) y 23.6 \pm 18.6 μ M en un cultivo celular de células cancerígenas de pulmón (NCIH292) (Dumontet et al., 2018).

5.1.2. RATONES

Ratones C57BL/6, OT-I, CD73KO, se obtuvieron en *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, USA). Los ratones OT-I contienen una inserción genética que en linfocitos T CD8+ permite la expresión de un TCR transgénico (cadenas V α 2 y V β 5) con especificidad contra un péptido de la ovoalbúmina (OVA 257-264), presentado en contexto MHC-I H2-Kb. El fenotipo de los ratones OT-I fue verificado en cada experimento por citometría de flujo (FACS) mediante un marcaje en sangre con anticuerpos contra V α 2 y V β 5. Los ratones CD73KO contienen un remplazo del exón 3 del gen ecto-5' nucleotidasa (Nt5e) por un neo cassette, lo cual genera que la expresión de la ectonucleotidasa CD73 y su actividad sea abolida. Todos los ratones se mantuvieron en el bioterio de la Fundación Ciencia y Vida en condiciones libres de patógenos específicos. Para los experimentos se utilizaron ratones entre 6-12 semanas de edad.

5.2. Métodos

5.2.1. Aislamiento de células de bazo y linfonodo

Para la obtención de células de bazo, se extrajo el bazo del ratón, se recibió en una placa Petri con 10 mL de RPMI + 10% SFB y se perfundió para obtener una suspensión celular. Esta suspensión se centrifugó a 600 x g por 7 minutos a 4 °C y el pellet se resuspendió en 2 mL de buffer de lisis de glóbulos rojos (RBC Lisis Buffer, eBioscience) y luego se incubó por 5 minutos en hielo. Las células se lavaron con RPMI + 10% SFB y se resuspendieron en 10 mL del mismo medio.

Para la obtención de células de los linfonodos periféricos (PLN, por *Peripheral Lymph Node*), se extrajeron y disgregaron mecánicamente con una tijera. La suspensión celular obtenida se filtró con una malla metálica de 90 μm y luego se llevó a un volumen de 5 mL con RPMI + 10% SFB. Para determinar el número de células obtenidas, se tomó una alícuota de la suspensión celular y se contaron en una cámara de Neubauer con la tinción de azul de tripán.

5.2.2. Cell sorting de linfocitos T CD8+ vírgenes

Para aislar los linfocitos T CD8+ vírgenes, se realizó un marcaje de superficie de las células obtenidas luego de la separación inmunomagnética. Para esto, se incubaron 10×10^6 linfocitos T CD8+ totales en 100 μL de PBS + 2% SFB con anticuerpos contra CD8a BV421, CD25 PE, CD62L FITC y CD44 BV510 durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Luego de la incubación se lavaron las células con 1 mL de PBS + 2% SFB y se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos a 4 °C. A continuación, las células se resuspendieron en RPMI + 10% SFB y se aislaron los linfocitos T CD8+ vírgenes (CD8a+/CD25-/CD44^{lo}/CD62L^{hi}) mediante *cell sorting* (FACSAria III, BD Biosciences).

5.2.3. Activación de células T CD8+ *in vitro*

Para obtener células T CD8+ efectoras, se aislaron células T CD8+ vírgenes a partir de bazo de ratones C57BL/6 (WT) y de ratones *knockout* para CD73 (CD73KO), tal como se describió anteriormente, para luego activarlas para generar linfocitos T CD8+ citotóxicos. Para esto, las células T CD8+ vírgenes se incubaron con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de α -CD3 (clon 145-2C11, BioLegend) y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ α -CD28 (clon 37.51, BioLegend) ambos soluble en presencia de

10ng/mL de mrlL-2 (Biolegend) por 3-4 días, en medio RPMI + 10% suero fetal bovino (SFB), 0,25 µg/mL fungizona y 0,05 µM de β-mercaptoetanol. El cultivo se incubó durante a 37°C y 5% CO₂, luego de lo cual se recuperaron y se analizaron distintos marcadores por citometría de flujo.

5.2.3. Activación de células T CD8+ *in vivo*

Se purificaron células T CD8 + vírgenes como se describió anteriormente (Sección 5.2.2), pero a partir de ratones OT-I. Se inyectaron 1x10⁶ células OT-I CD8+ vírgenes vía intravenosa (i.v.) en ratones CD45.1+ y 24h después, los ratones receptores recibieron una inyección intraperitoneal (i.p.) de proteína OVA (500 mg, Sigma-Aldrich) y LPS (25 mg, Sigma-Aldrich). En los días 4, 7, 12 y 28 se sacrificaron los ratones y se extrajo sangre a través de una punción cardíaca. Los glóbulos rojos se lisaron usando un tampón de lisis de glóbulos rojos RBC (eBioscience) durante 5 min en hielo. La suspensión celular luego se centrifugó, se tiñó y se resuspendió en PBS + SFB al 2% para análisis por citometría de flujo.

5.2.4. Evaluación de moléculas de superficie por citometría de flujo

La caracterización de las moléculas de superficie celular se realizó por medio de citometría de flujo multiparamétrica (FACSCanto II, BD Biosciences). Para la detección de moléculas de superficie mediante citometría de flujo, entre 0,2-1,0 x 10⁶ células se incubaron con un anticuerpo contra CD16/CD32 (Fc Block) en PBS + 2% SFB durante 20 minutos a 4°C en oscuridad, para bloquear los receptores Fc. Luego, se lavaron con PBS+2% SFB y se centrifugaron 600xg por 7 minutos a 4°C. Posteriormente, las células se incubaron con los respectivos anticuerpos fluorescentes y con Fixable Viability Dye eFluor780

(eBioscience) para descartar las células muertas, en PBS + 2% SFB durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Pasada la incubación, las células se lavaron con PBS + 2% SFB y se centrifugaron 600xg por 7 minutos a 4°C. Posteriormente, las células se resuspendieron en 200 µL de PBS + 2% SFB, para ser analizados por citometría de flujo.

5.2.5. Evaluación de células productoras de citoquinas por citometría de flujo

Para analizar la producción de citoquinas por los linfocitos T CD8+, las células se re-estimularon con 0,25 µM PMA (Sigma-Aldrich) y 1 µg/ml ionomicina (Sigma-Aldrich) en presencia de GolgiPlug (BD Biosciences) por 4h y luego se realizó el marcaje de superficie e intracelular. Las células se marcaron en la superficie y luego se fijaron y permeabilizaron utilizando el kit Cytofix/Cytoperm (Biolegend) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, el pellet celular se resuspendió en 300 µL de Buffer de fijación/permeabilización 1X (previamente diluido por el diluyente de fijación/permeabilización) y se incubó por 20 minutos a 4°C en oscuridad. Luego del tiempo de incubación, las células se lavaron con 500 µL de Buffer de permeabilización y se centrifugaron a 600xg por 7 minutos a 4°C. Posteriormente, se resuspendieron en 100 µL de Buffer de permeabilización con los anticuerpos intracelulares correspondientes, siendo incubadas por 30 minutos a 4°C en oscuridad. Luego de la incubación, la suspensión celular se lavó con 700 µL de Buffer de permeabilización y se centrifugó a 600xg por 7 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en 200 µL de PBS + 2% SFB, para ser analizadas por citometría de flujo.

5.2.6. Ensayo de producción de adenosina

Para medir la adenosina total producida por las células T CD8+, se usó *Adenosine Assay Kit* (Cell Biolabs). Para esto se utilizaron 2 metodologías, primero se analizó el medio de cultivo en el que las células fueron cultivadas, este fue centrifugado a 600 x g por 10 minutos a 4 °C para remover debris, y el sobrenadante fue analizado directamente o diluido en PBS. Además, se analizó la producción de adenosina de las células T CD8+ vírgenes y activadas que fueron cultivadas por 1h en medio HBSS suplementado con AMP (10 µM). Luego las células se centrifugaron a 600 x g por 10 minutos a 4 °C y se analizó el sobrenadante. Se preparó una curva estándar con una solución de adenosina de 0 a 100 µM. Luego se agregó 50 µL de cada estándar y 50 µL de cada muestra, a una placa oscura de 96 pocillos y se mezcló con 50 µL del *Mix de Reaction* (10µL de *Fluometric Probe*, 200 mU/mL de HRP, 2 U/mL de adenosina deaminasa, 1,89 U/mL de purina desfosforilasa y 25 mU/mL de xantina oxidasa). Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se leyó la placa con un equipo lector de microplacas fluorescente para excitar a 530-570 nm y la emisión en 590 – 600 nm.

5.2.7. Evaluación de receptor de adenosina A2A por citometría de flujo

Para analizar la expresión del receptor de adenosina A2A en linfocitos T CD8+, las células se activaron de forma policlonal *in vitro*. Para esto, se incubaron células de PLN en placas de 96 pocillos de fondo redondo a 0,2 x 10⁶ células por pozo en 200 µL de RPMI + 10% SFB suplementado con los anticuerpos solubles αCD3 (clon 145-2C11, BioLegend) y αCD28 (clon 37.51, Biolegend) ambos a una concentración final de 1 µg/mL y se incubaron a 37 °C y 5% CO₂. Posteriormente al tiempo de cultivo se centrifugaron las células a 600 x g

por 7 minutos a 4 °C y se resuspendieron en PBS + 2% SFB. Los linfocitos T se marcaron en su superficie, y luego se fijaron y permeabilizaron con *Fixation/Permeabilization Buffer* (eBioscience). Se incubaron por 20 minutos a 4°C en oscuridad. Luego de la incubación, se lavaron con *Permeabilization Buffer* (BD Biosciences) y se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C. Luego las células se incubaron con el anticuerpo fluorescente α -A2AR (Novus Biological, clon NBP1-39474APC) durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron en *Permeabilization Buffer*, se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y se resuspendieron en 200 μ L de PBS + 2% SFB para ser analizados por citometría de flujo.

5.2.8. Evaluación de marcadores de citotoxicidad por citometría de flujo

Para analizar la expresión intracelular de granzima B en linfocitos T CD8+, las células se activaron de forma policlonal *in vitro*. Para esto, se incubaron células de PLN en placas de 96 pocillos de fondo redondo a $0,2 \times 10^6$ células por pozo en 200 μ L de RPMI + 10% SFB suplementado con los anticuerpos solubles α CD3 (clon 145-2C11, BioLegend) y α CD28 (clon 37.51, Biolegend) ambos a una concentración final de 1 μ g/mL. Las células se incubaron a 37 °C y 5% CO₂, posteriormente se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos a 4 °C y se resuspendieron en PBS + 2% SFB. Los linfocitos T de PLN se marcaron en su superficie, y luego se fijaron y permeabilizaron con *Fixation/Permeabilization Buffer* (eBioscience). Se incubaron por 20 minutos a 4°C en oscuridad. Después de la incubación, se lavaron con *Permeabilization Buffer* (BD Biosciences) y se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C. Luego las células se incubaron con el anticuerpo fluorescente α -GzmB durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron en *Permeabilization Buffer*,

se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y se resuspendieron en 200 µL de PBS + 2% SFB para ser analizados por citometría de flujo.

5.2.9. PCR cuantitativo en tiempo real

Para analizar la expresión de los mRNA de T-bet y Blimp-1, en células T CD8+ se realizó un PCR cuantitativo en tiempo real. Los linfocitos son aislados del bazo y/o PLN mediante *cell sorting* y luego estos linfocitos fueron activados. Se extrajo mRNA con el kit EZNA total RNA (Ω Bio-Tek) con digestión de DNA en columna (DNase set RNase free, Ω Bio-Tek). Luego se cuantificó el mRNA en un espectrofotómetro (NanoPhotometer, IMPLEN) y se sintetizó cDNA a partir de 1 µg de mRNA. Para analizar el cDNA se utilizó el kit *Superscript First Strand Synthesis System for RT-PCR* (Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la reacción de PCR en tiempo real se utilizaron 5 µL de cDNA, 10 µL de *Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix* (Agilent Technologies), partidores (375-800 nM) y agua libre de nucleasas hasta completar 20 µL. Todas las reacciones se realizaron con el sistema *Stratagene Mx3000P* (Agilent Technologies) en 40 ciclos, con una T° de denaturación de 95°C, de *annealing* de 58°C y de elongación de 72°C. Los niveles de expresión relativos se calcularán utilizando el ΔC_t entre el gen de interés y el gen constitutivo *hprt* (hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa). Además, los datos fueron normalizados por la expresión relativa de los linfocitos T CD8+ vírgenes.

5.2.10 Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa GraphPad Prism 6. Se comprobó si las muestras presentaban una distribución normal mediante el test de Shapiro-

Wilk, la cual, al resultar negativa se decidió por análisis de pruebas no paramétricas. Para los análisis entre dos grupos de datos, se utilizó el test de t-student de dos colas, por otra parte, para análisis entre más de dos grupos se utilizó análisis de una vía con el test de Kruskal - Wallis. Todos los resultados se muestran como el promedio de al menos un $N \geq 3$ junto a su error estándar. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con un p-valor $<0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE CD73 Y CD39 DURANTE LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD8+ *IN VITRO*

La expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 fue inicialmente descrito en células tumorales, linfocitos T reguladores y células mieloides supresoras (MDSCs) (Kobie et al., 2006; Borsellino et al., 2007; Deaglio et al., 2007; Li et al., 2017). Sin embargo, también han sido descritas en linfocitos T CD8+ (Flores-Santibáñez et al., 2015; Raczkowski et al., 2018). Con el fin de dilucidar la cinética de expresión de los componentes de la señalización adenosinérgica durante la activación de linfocitos T CD8+, se aislaron linfocitos T CD8+ vírgenes mediante cell sorting (CD44^{int}/CD62L^{hi}/CD25⁻/CD8⁺). Luego, se activaron estos linfocitos con anticuerpos solubles contra CD3 y CD28 en presencia de IL-2 para inducir su diferenciación en células efectoras (Sukumar et al., 2013). Finalmente se analizó la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 a diferentes tiempos de activación *in vitro*. (Fig. 3).

Para comprender el rol de CD73 durante la activación de las células CD8+, se analizó el marcador de activación CD25, la cual constituye la subunidad α del receptor para la interleuquina-2 y cuya expresión es inducida luego de la señalización del TCR (Kalia et al., 2010; Obar et al., 2010). Cuando se analiza la expresión de las ectonucleotidasas antes de la activación de células T CD8+, observamos que alrededor de un 70% de las células vírgenes expresan CD73, pero carecen de CD39 (Fig. 3A-B). Luego de la activación de estas células, la expresión de CD73 aumenta, llegando a su máxima expresión después de 3 días de activación (Fig. 3B-C). Por otra parte, a los 3 días luego de activación observamos que

comienza a expresarse CD39, alcanzando su máxima expresión a los 4 días luego de la activación (Fig. 3B-D). Así, la expresión conjunta de las enzimas CD73 y CD39 en las células T CD8+ activadas se obtiene luego de 3-4 días de cultivo (Fig. 3B).

Así, al cuantificar la expresión de CD73 durante la activación *in vitro* a través de la intensidad media de fluorescencia o MFI (Mean fluorescence intensity), los resultados indican que la expresión de CD73 en los linfocitos aumenta significativamente luego de 3 a 4 días de activación al ser comparados con las células vírgenes (Fig. 3C). Además, se realizó la cuantificación de la expresión de CD39 durante la activación de los linfocitos T CD8 a través de MFI, observando que esta ectonucleotidasa aumenta su expresión significativamente luego de 4 días de activación *in vitro* (Fig. 3D). Estos datos sugieren que las células T CD8+ activadas tendrían la maquinaria para producir adenosina a partir de ATP.

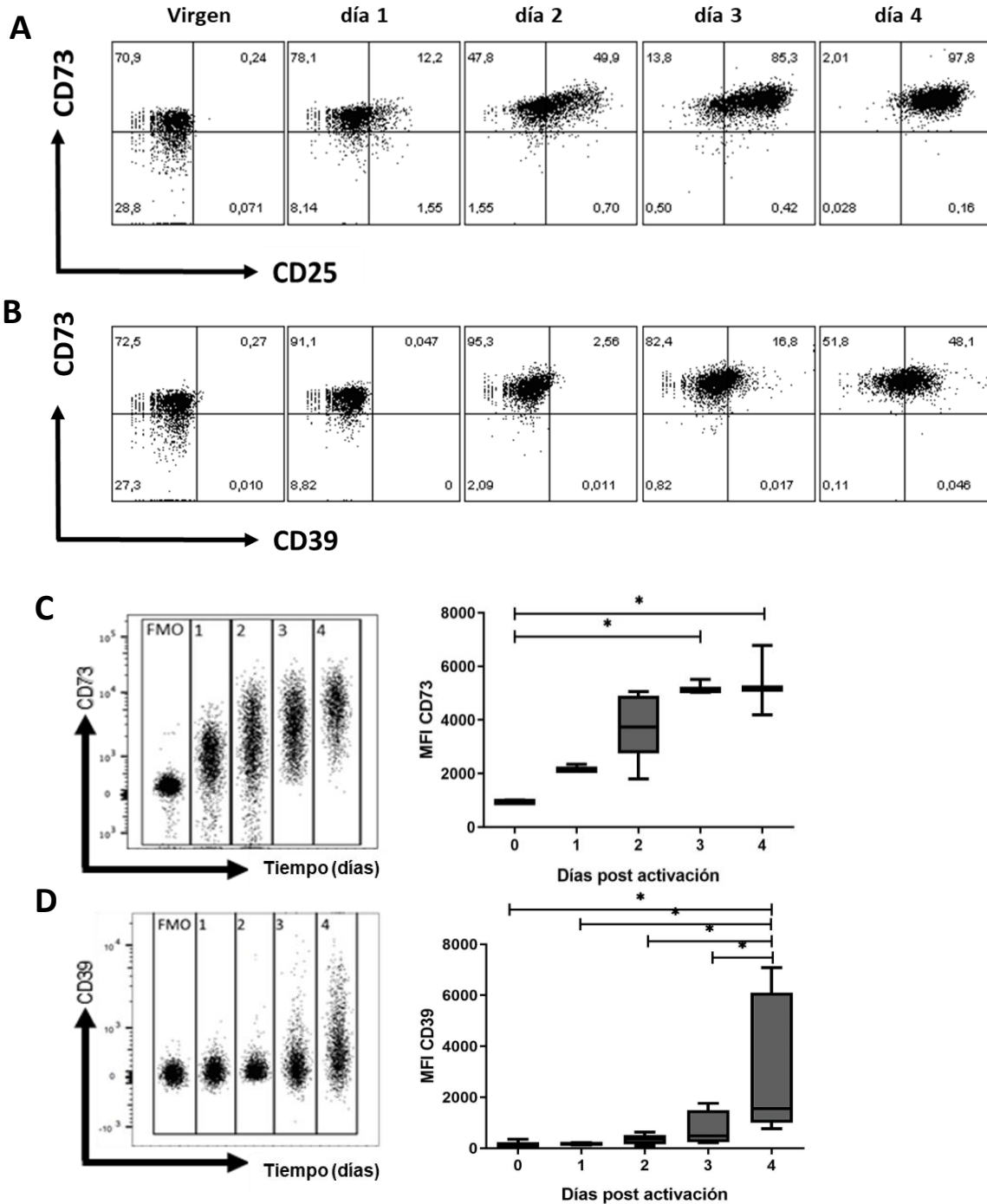


Figura 3. CD73 aumenta su expresión durante la activación *in vitro* de linfocitos T CD8+. Se aislaron linfocitos T CD8+ vírgenes a partir de ratones WT y se activaron *in vitro* con anticuerpos solubles α -CD3 y α -CD28 (1 μ g/mL) durante 4 días en presencia de IL-2 (10 ng/mL). Se evaluó la expresión de CD73, CD39 y CD25 mediante citometría de flujo. (A-B) Gráfico de puntos representativo del fenotipo de los linfocitos T CD8+ durante los días de activación. (C) Izquierda, Concatenación de la expresión de CD73 después de la activación. Derecha, Intensidad media de fluorescencia de CD73 por día después de la activación n=5. (D) Izquierda, Concatenación de la expresión de CD39 después

de la activación. Derecha, Intensidad media de fluorescencia de CD39 por día después de la activación n=5. Kruskal-Wallis Test, * $p < 0.05$

A continuación, analizamos la expresión de las enzimas CD73 y CD39 durante la división celular luego de la activación (Fig. 4). Para esto, se marcaron las células T CD8+ vírgenes con *Cell Trace Violet* (CTV) y luego fueron activadas *in vitro* por 3 días con anticuerpos contra CD3 y CD28 en presencia de IL-2. Esta tinción permite observar la división de los linfocitos T CD8+, ya que se diluye cada vez que la célula se divide. Así, se observa que las células sin proliferación presentan una mayor intensidad de fluorescencia que aquellas células que han tenido varios ciclos de proliferación.

Luego de 3 días de activación se pueden observar alrededor de 6 ciclos de proliferación (Fig. 4A) y al analizar la expresión de CD73 se puede observar que la expresión de CD73 disminuye en células con más rondas de proliferación (Fig. 4C). Por el contrario, se observa que la expresión de CD39 (Fig. 4B) aumenta en cada ronda de proliferación. A pesar de la disminución de CD73 en las células que presentan más ciclos de proliferación, la expresión de CD73 va en aumento después de la activación (Fig. 4D) consistentemente con lo observado en la figura 2. Estos resultados sugieren que la expresión de las enzimas CD73, CD39 están regulados positivamente en condiciones de activación *in vitro*.

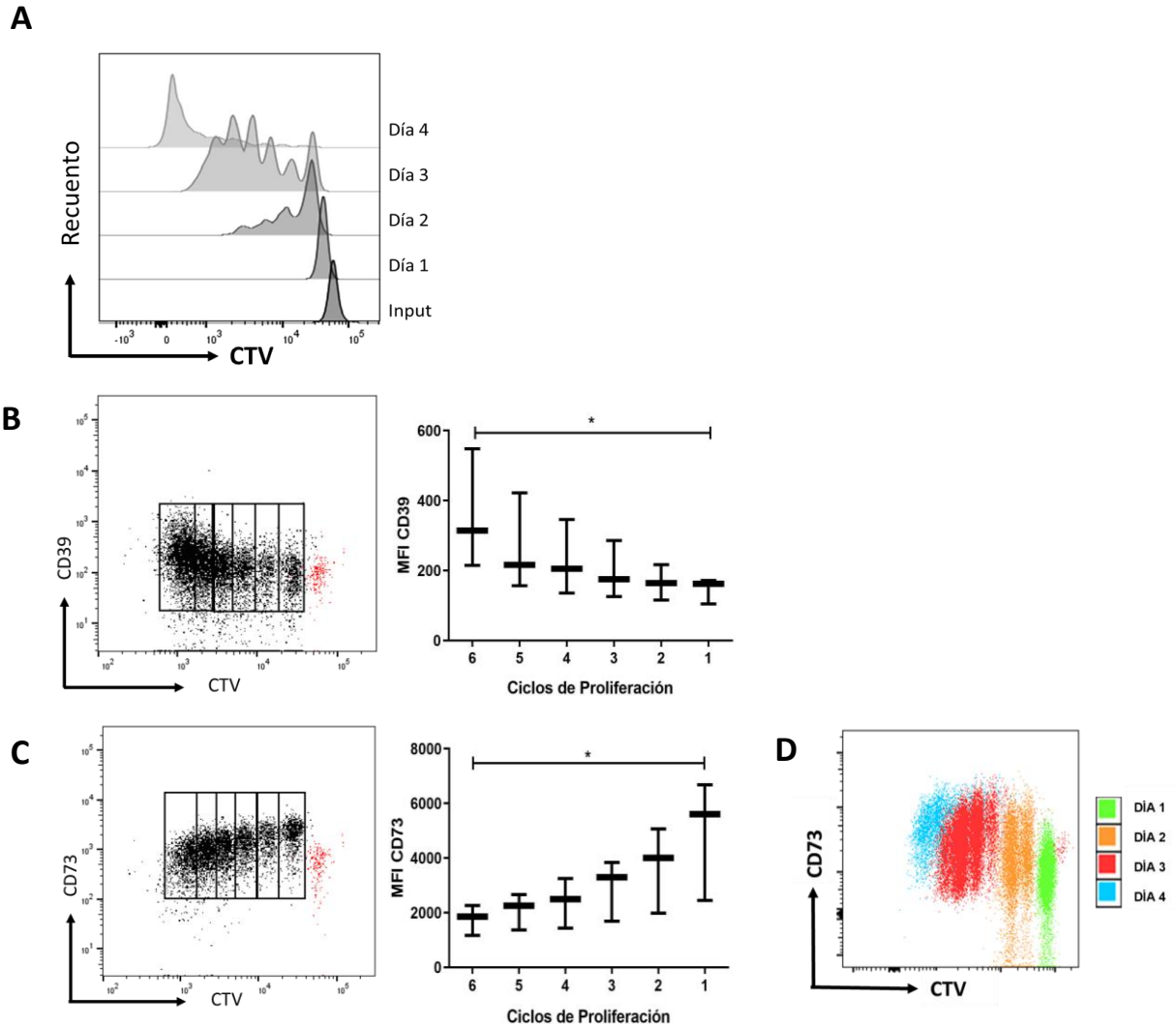


Figura 4. Expresión de CD73 y CD39 durante la proliferación celular. Se aislaron linfocitos T CD8+ vírgenes a partir de ratones WT y se marcaron con la tinción CTV. Luego se activaron *in vitro* con anticuerpos solubles α -CD3 y α -CD28 (1 ug/mL) durante 3 días en presencia de IL-2 (10 ng/mL). (A) Histograma que muestra la dilución de la marca de CTV a través de los días de activación. (B) Izquierda, Citometría de flujo de la expresión de CD39 frente a CTV, población en rojo es el input (día 0). Derecha, Intensidad media de fluorescencia de CD39 en cada ciclo de proliferación n=3. (C) Izquierda, Citometría de flujo de la expresión de CD73 frente a CTV, población en rojo es el input (día 0). Derecha, Intensidad media de fluorescencia de CD73 en cada ciclo de proliferación n=3. (D) Superposición de la expresión de CD73 con CTV en cada día de cultivo de activación. CTV: Cell Trace Violet. Kruskal-Wallis Test, * $p < 0.05$

6.2. PRODUCCIÓN DE ADENOSINA EN CÉLULAS T CD8+

La presencia de CD39 y CD73 en linfocitos T CD8+ activados indica que éstos presentan la maquinaria necesaria para la producción de adenosina, por lo que a continuación se cuantificó adenosina producida durante la activación *in vitro*. Para esto linfocitos T CD8+ vírgenes fueron activados *in vitro* por 4 días con anticuerpos contra CD3 y CD28 en presencia de IL-2, y se analizó la concentración de adenosina en el medio de cultivo de las células al segundo y último día de la activación. Se observa que en el medio de cultivo de los linfocitos hay producción de adenosina (Fig. 5A) sobre los niveles basales del medio de cultivo (línea punteada, 5µM), sin diferencia estadísticas entre la concentración de adenosina en los medios de cultivo luego de 2 o 4 días de activación.

Para analizar con mayor detalle la producción de adenosina por los linfocitos T CD8+, luego de la activación de las células por 3 días, se lavaron los linfocitos T CD8+ activados y se cultivaron con AMP (10 µM), sustrato de la enzima CD73, por 1h. Nuestros resultados sugieren que las células activadas producen niveles levemente mayores de adenosina que las células vírgenes (Fig. 5B), pero se requiere un mayor número de repeticiones experimentales para determinar diferencias significativas. Además, la utilización del inhibidor enzimático de CD73 (APCP, 50 µM) en células activadas provoca una reducción de los niveles de adenosina, lo que podría indicar que gran parte de la adenosina producida por las células activadas es resultado de la actividad enzimática de CD73 (Fig. 5B).

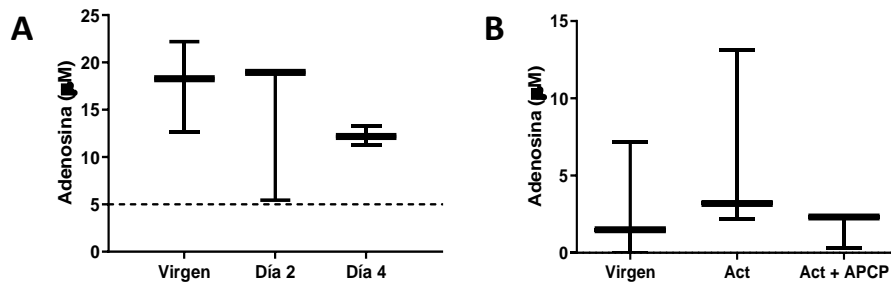


Figura 5. Producción de adenosina por las células CD8+. Se aislaron linfocitos T CD8+ vírgenes a partir de ratones WT y se activaron *in vitro* con anticuerpos solubles α -CD3 y α -CD28 (1 μ g/mL) durante 4 días en presencia de IL-2 (10 ng/mL). Se determinó la concentración de adenosina mediante un kit fluorimétrico (Cell Biolabs). (A) Concentración de adenosina en el medio de cultivo 2 y 4 días después de la activación n=3. (B) Concentración de adenosina producida por células CD8+ vírgenes o activadas cultivadas en presencia de AMP (10 μ M) por 1 hora. En algunos experimentos se agregó APCP (50 μ M), el inhibidor enzimático de CD73. Act: Activados. n=3 experimentos independientes.

6.3. AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE CD73 EN LINFOCITOS T CD8+ DURANTE LA RESPUESTA INMUNE *IN VIVO*

Para evaluar *in vivo* la expresión de las enzimas CD73 y CD39 utilizamos ratones transgénicos para los linfocitos T CD8+ OT-I de fondo genético C57BL/6 (H-2^b), en los cuales las células T CD8+ reconocen específicamente un péptido derivado de la proteína ovoalbúmina (OVA 257-264) presentado en moléculas de histocompatibilidad de clase-I H-2^b. Estos ratones tienen la particularidad de expresar el alelo CD45.2 (marcador congénico) en los leucocitos. De los ratones OT-I se aislaron células T CD8+ vírgenes (CD45.2+) las cuales se inyectaron de manera intravenosa (i.v.) en ratones isogénicos C57BL/6 que expresan el marcador CD45.1 (lo cual permite discriminar entre las células CD8+ OT-I inyectadas al ratón y las células CD8+ propias del ratón). Después de 24h de haber transferido las células, el ratón receptor se inmunizó intraperitonealmente con la proteína OVA (500mg) y LPS (25mg) para activar las células inyectadas provenientes del ratón OT-I. Este sistema permite activar

las células inyectadas y poder seguir su activación *in vivo*. Los días 4, 7, 12 y 28 después de la activación se obtuvieron muestras de sangre del ratón receptor para analizar la expresión de CD73 y CD39 en las células T transferidas (CD8+/CD45.2+).

El proceso de activación fue analizado mediante la expresión de los marcadores CD44 y CD62L en las células T CD8+ CD45.2+ (Fig. 6). Como se observa en la figura 6, las células aumentan la expresión de CD44 desde el día 4, lo que indica que las células T CD8+ inyectadas se activaron. La proteína CD44, una molécula de adhesión relacionada con migración y activación de los linfocitos T (Baaten et al., 2010) y CD62L (L-selectina) permite diferenciar células efectoras (CD44+ CD62L-) que pierden CD62L (Yang et al., 2011) de las células de memoria (CD44+/CD62L+). Al día 7, se observa que un 66% de células poseen un fenotipo efector (CD44+/CD62L-), siendo significativamente mayor que las células precursoras de memoria (CD44+/CD62L+) (Fig. 6A-B), lo cual concuerda con los datos de la literatura donde el día 7 se considera la etapa efectora (Gattinoni, Klebanoff, and Restifo 2012). A partir del día 21 se observa un aumento de las células de memoria central (CD44+/CD62L+) lo que concuerda con datos de la literatura que indican que a partir del día 28 se puede observar la etapa de memoria (Fig. 6A-B).

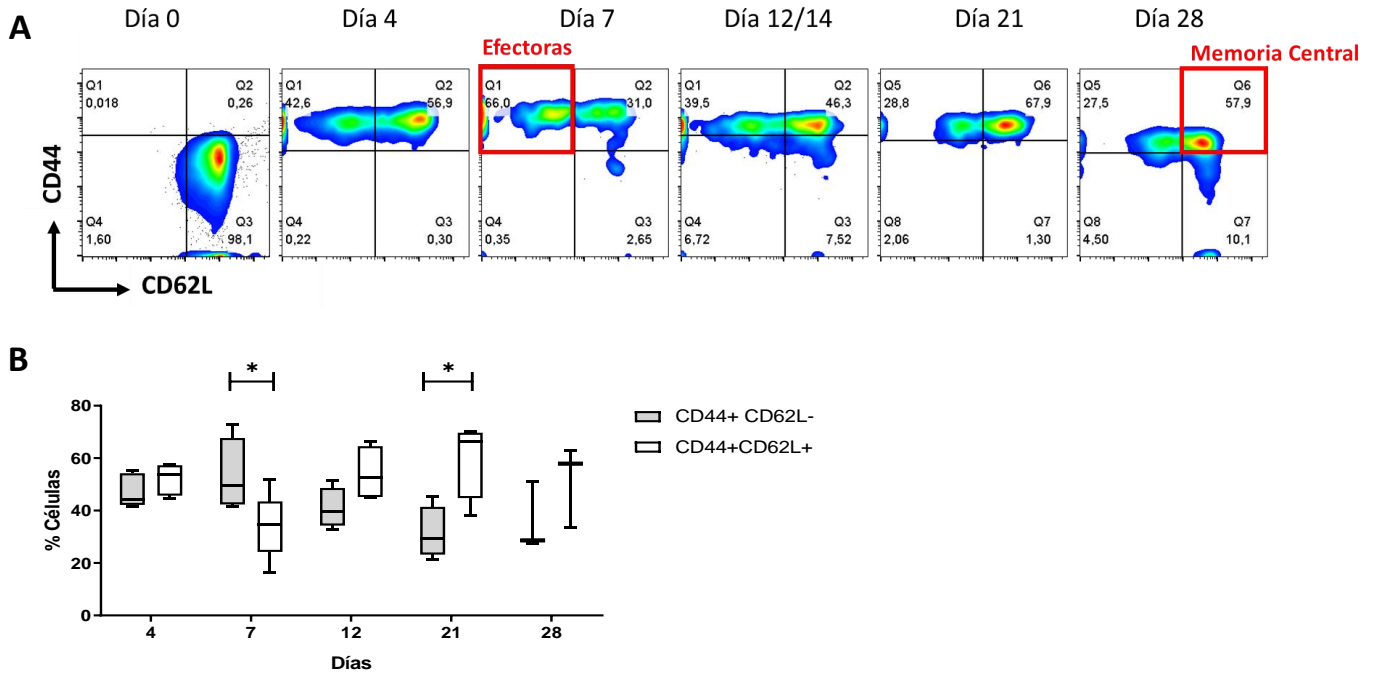


Figura 6. Respuesta inmune *in vivo* de células CD8+ luego de la inmunización con OVA+LPS. Células CD8+ vírgenes obtenidas de ratones OT-I fueron aisladas por *Cell Sorting* y se inyectaron en ratones CD45.1+. Luego de 24h los ratones se inyectaron con OVA (500mg) y LPS (25mg). Luego a los 4, 7, 12, 21 y 28 días después de la activación se analizó la expresión de CD73 y CD39 en los linfocitos T transferidos obtenidos a partir de muestras de sangre. (A) Citometría de flujo para evaluar la expresión de CD44 y CD62L en las células transferidas durante la respuesta inmune. (B) Porcentaje de células CD44+/CD62L- y CD44+/CD62L+, dentro de las células CD8+ CD45.2+ que fueron transferidas durante el transcurso de la respuesta inmune n=3. Student t Test, * p < 0.05

A continuación, se analizó la expresión de las ectonucleotidasas CD73 y CD39 en las células efectoras (CD44+/CD62L-). Como se muestra en la Fig. 7A, los linfocitos T CD8+ vírgenes expresan CD73 y carecen de CD39, tal como se vio en el primer ensayo (Fig. 3). Si bien durante los primeros días luego de la activación no se observan diferencias significativas en la intensidad de media fluorescencia (MFI) de CD73, para el día 12 y 28 se observa un aumento significativo de la expresión de esta ectonucleotidasa (Fig. 7A-B). Por otro lado, la expresión de CD39 es baja al inicio del ensayo, pero va en aumento hasta el día 12. La expresión de CD39 luego cae en la fase de memoria al día 28, quedando en niveles

semejantes a las células vírgenes (Fig. 7A-C). Coincide que el punto más alto observado de la expresión de ambas ectonucleotidasas es al día 12, lo que corresponde a la fase efectora. analizada en la figura 6.

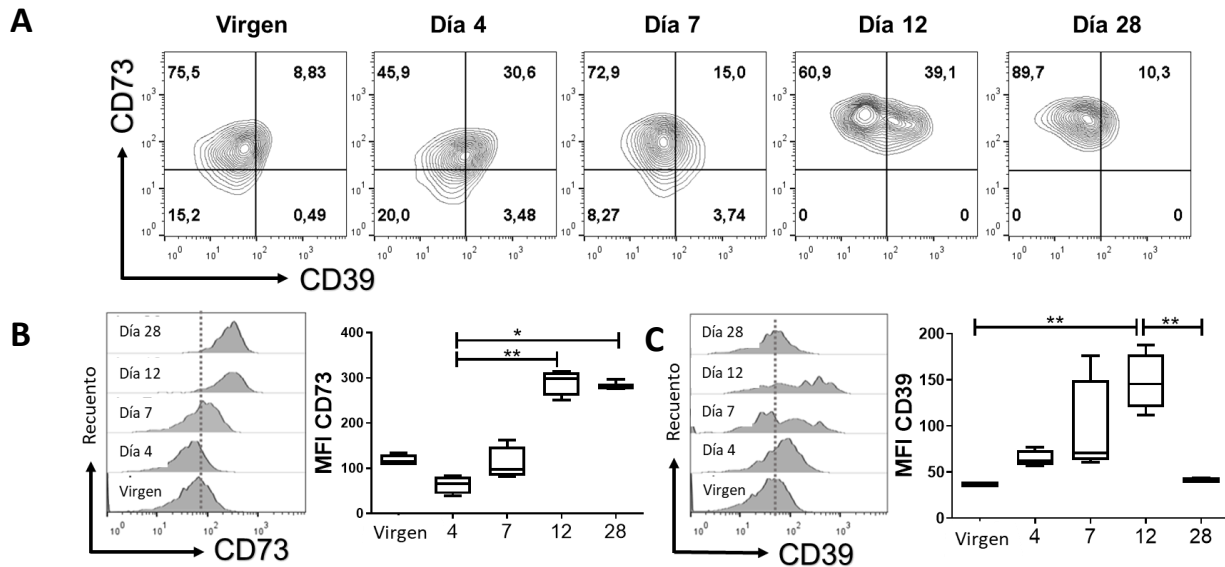


Figura 7. Cinética de expresión de ectonucleotidasas CD73 y CD39 durante la activación *in vivo* de las células CD8⁺/CD44⁺/CD62L⁻. Células vírgenes T CD8⁺ CD45.2⁺ obtenidas de ratones OT-I fueron aisladas a través de *Cell Sorting* y se transfirieron a un ratón receptor CD45.1⁺. A las 24h se inyectaron los ratones receptores con OVA (500mg) y LPS (25mg) de manera intraperitoneal. A los días 4, 7, 12 y 28, se analizó la expresión de CD73 y CD39 en las células transferidas obtenidas a partir de muestras de sangre. (A) Gráfico de puntos representativo de la expresión de CD73 y CD39 de los linfocitos T transferidos CD8⁺/CD44⁺/CD62L⁻ durante los días de activación. (B) Izquierda, histograma de la expresión de CD73 durante la respuesta inmune. Derecha, gráfico de la intensidad de fluorescencia (MFI) de CD73 en los días 4, 7, 12 y 28 n=4. (C) Izquierda, histograma de la expresión de CD39 durante la respuesta inmune. Derecha, gráfico de la intensidad de fluorescencia (MFI) de CD39 a los días 4, 7, 12 y 28 n=4. Kruskal-Wallis Test, *p < 0.05; **p < 0.01

Las células que mantienen la expresión de CD62L, además de la expresión de CD44, se encuentran menos comprometidas hacia el fenotipo efectora y son consideradas células de memoria central para el día 28 después de la activación (Fig. 8). En esta población de células se analizó la expresión de CD73 y CD39 durante la activación *in vivo*. La expresión de CD73 no muestra diferencias significativas durante los primeros días de activación. El día 12 y 28

muestran un aumento significativo de la expresión de CD73 (Fig. 8A-B). La expresión de CD39 se mantiene baja en estas células y es prácticamente nula durante la fase de memoria, lo cual es consistente con el bajo compromiso efector de esta población (Fig. 8A-C).

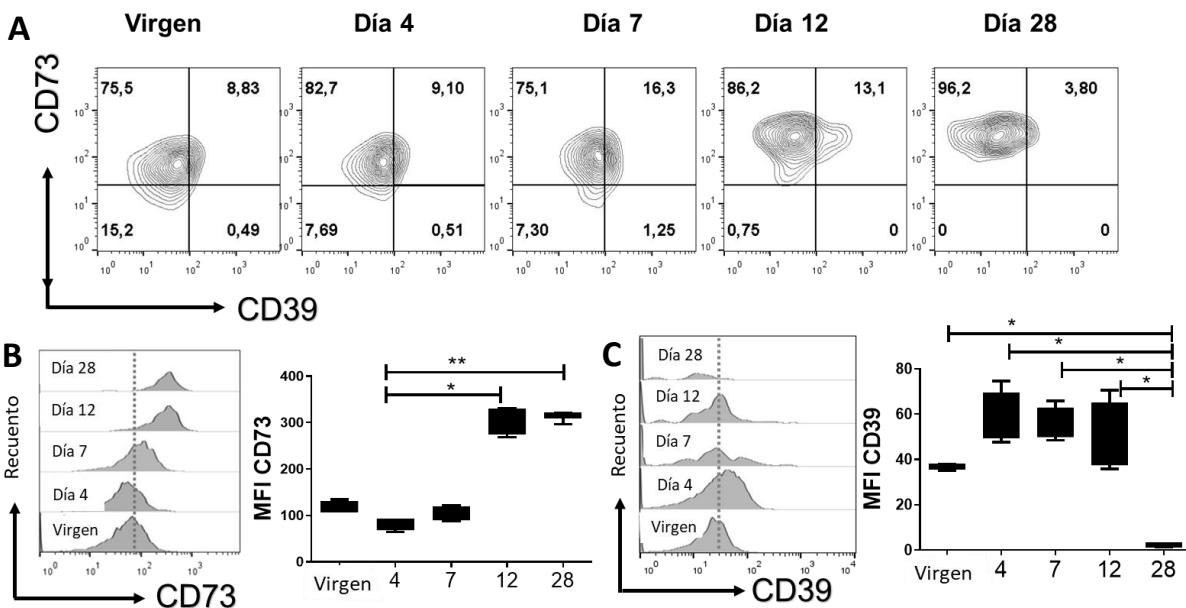


Figura 8. Cinética de expresión de ectonucleotidasas CD73 y CD39 durante la activación *in vivo* de las células CD8⁺/CD44⁺/CD62L⁺. Células T CD8⁺/CD45.2⁺ vírgenes fueron aisladas mediante *Cell Sorting* a partir de ratones OT-I y se transfirieron a un ratón receptor CD45.1⁺. A las 24h se inyectaron los ratones receptores con OVA (500mg) y LPS (25mg) de manera intraperitoneal. A los días 4, 7, 12 y 28, se analizó la expresión de CD73 y CD39 en las células transferidas obtenidas a partir de muestras de sangre. (A) Gráfico de puntos representativo de la expresión de CD73 y CD39 de los linfocitos T transferidos CD8⁺/CD44⁺/CD62L⁺ durante los días de activación. (B) Izquierda, histograma de la expresión de CD73 durante la respuesta inmune. Derecha, gráfico de la intensidad de fluorescencia (MFI) de CD73 en los días 4, 7, 12 y 28 n=4. (C) Izquierda, histograma de la expresión de CD39 durante la respuesta inmune. Derecha, gráfico de la intensidad de fluorescencia (MFI) de CD39 en los días 4, 7, 12 y 28 n=4. Kruskal-Wallis Test, *p < 0.05; **p < 0.01.

En resumen, los resultados *in vitro* e *in vivo*, muestran que la expresión de la ectonucleotidasa CD73 es regulada positivamente durante la activación de las células T CD8⁺. Además, se observa co-expresión de CD73 y CD39 en la fase efectora de las células, el día 12 de la activación *in vivo*, o el día 3-4 en la activación *in vitro*.

6.4. EXPRESIÓN DE A2AR EN LOS LINFOCITOS T CD8+ ACTIVADOS *IN VITRO*

Los receptores A2 (A2A y A2B) responden a la adenosina en el medio extracelular, pero el receptor A2A presenta un mayor afinidad por la adenosina y ha sido identificado como un sensor y protector del daño tisular excesivo provocado por la inflamación (Ohta and Sitkovsky, 2001; Sitkovsky and Ohta, 2005). Además, la expresión de A2AR aumenta luego de la activación en linfocitos T CD4+ (Lappas et al., 2005). Debido a esto es que analizamos la expresión del receptor de adenosina A2AR en células CD8+, y analizar el papel de CD73 en la señalización adenosinérgica. Se utilizó un ratón *knockout*, que no presenta el gen para la ectonucleotidasa CD73 (CD73KO) con el fin de determinar el efecto de CD73 en la vía de señalización adenosinérgica. Se analizó la expresión del receptor de adenosina (A2AR) por citometría de flujo y su expresión génica luego de activar las células CD8+ vírgenes con anticuerpos solubles contra CD3 y CD28 e IL-2 por 3 días.

Lo primero que analizamos fue la expresión génica de A2AR, a través de expresión relativa de su mensajero, en células T CD8+ WT y CD73KO activas *in vitro* por 3 días. Para esto, se extrajo RNA total de los linfocitos T CD8+ vírgenes WT y CD73KO y también desde linfocitos T CD8 activados *in vitro* WT y CD73KO. Se analizó la expresión genética de A2AR, con partidores específicos y además un gen constitutivo, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (*hppt*), medido a través de PCR en tiempo real (Real-time PCR). La expresión de A2AR en células activadas es normalizada con el gen constitutivo para luego analizar su expresión con respecto a las células vírgenes, obteniendo una expresión relativa de A2AR (Fig. 9A). Se observa en la figura 9A que la expresión de relativa de A2AR en las

células WT disminuye con respecto a las células vírgenes, ya que la diferencia es menor a 1, mientras que la expresión relativa de A2AR en las células CD73KO es mayor en las células activadas, ya que el valor es sobre 1. Al comparar la expresión de A2AR entre las células WT y CD73KO podemos ver que la ausencia de CD73 promueve la transcripción de A2AR luego de 3 días de activación *in vitro*. Cabe señalar que posiblemente no logramos detectar la inducción del mRNA (ARN mensajero) de A2AR en las células WT, porque se ha reportado que se induciría tempranamente (4 h) luego de la activación (Lappas et al. 2020).

Luego analizamos la expresión proteica de A2AR en células T CD8+ WT y CD73KO después 3 días de activación, a través de citometría de flujo. Podemos observar que no existe una diferencia significativa en la expresión de A2AR entre las células T CD8+ WT y CD73KO (Fig. 9B), por lo que la diferencia observada en el mensajero de A2AR no se condice con la expresión proteica. Además, se utilizó la tinción con CTV (Cell trace Violet) para ver los ciclos proliferativos y observar la cinética de expresión de A2AR durante la activación. En este ensayo podemos observar que la expresión de A2AR aumenta en cada ronda de proliferación siendo un aumento significativo cuando se compara el primer ciclo con los últimos (Fig. 9C). Los datos obtenidos nos muestran que la expresión de A2AR es similar en células T CD8+ WT y CD73KO, a pesar de la diferencia obtenido en la expresión de mRNA. Estos datos sugieren que la expresión de A2AR aumenta luego de la activación de las células T y a medida que las células proliferan.

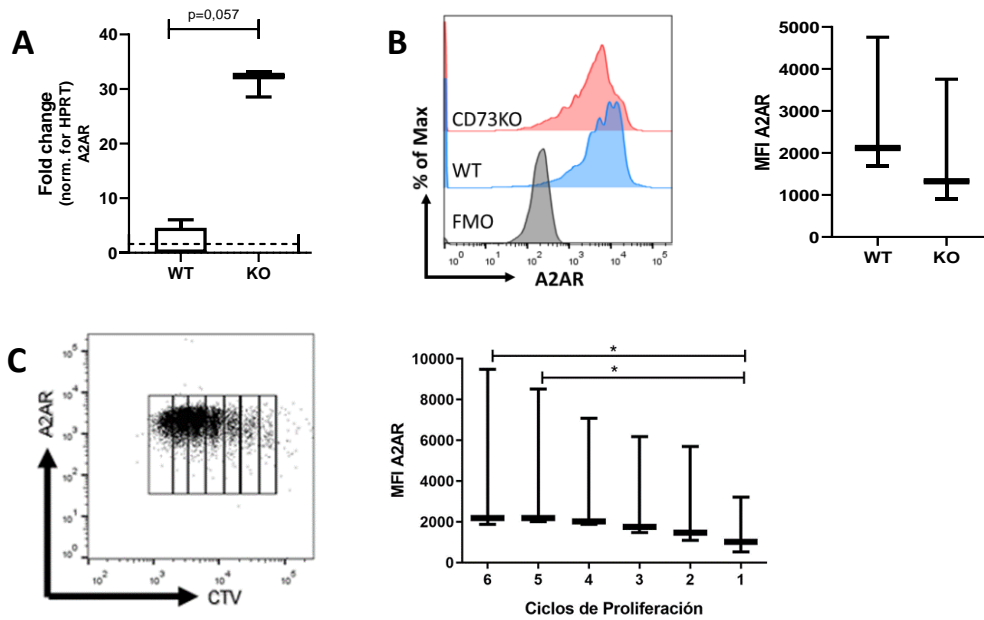


Figura 9. Expresión del receptor de adenosina A2AR en células T CD8+ activadas *in vitro* por 3 días. Se aislaron linfocitos TCD8+ vírgenes a partir de ratones WT y CD73KO. Luego se activaron *in vitro* con anticuerpos solubles α -CD3 y α -CD28 (1 μ g/mL) durante 3 días en presencia de IL-2 (10 ng/mL). Se evaluó la expresión de A2AR a través de PCR en tiempo real y por citometría de flujo. (A) Expresión relativa del mensajero de A2AR con respecto al linfocitos T vírgenes mediante PCR en tiempo real, n=3. (B) Izquierda, histograma de la expresión de A2AR en células WT y CD73KO. Derecha, gráfico de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de A2AR en células WT y CD73KO n=3. (C) Izquierda, citometría de flujo de la expresión de A2AR frente a CTV en células WT. Derecha, MFI de A2AR en cada ciclo de proliferación n=3. Mann Whitney Test (A-B). Kruskal-Wallis Test, * p < 0.05 (C).

6.5. CD73 INHIBE LA EXPRESIÓN DE CD25 EN LAS CÉLULAS CD8+

Para comprender el rol de CD73 durante la activación de las células CD8+, se analizó el marcador de activación CD25 (cadena alfa del receptor de la IL-2) en células T CD8+ WT y CD73KO activadas. Además, se utilizó APCP un inhibidor de la función enzimática de CD73 (Allard et al., 2017). Para esto, se aislaron células T CD8+ vírgenes y se incubaron *in vitro*

con α CD3/ α CD28 soluble en presencia de IL-2 por 4 días. Luego se analizó CD25 en cada uno de los días de activación y en las distintas condiciones, por citometría de flujo.

Al analizar la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la expresión de CD25 en cada uno de los días, se observa que la expresión de CD25 va en aumento, lo cual confirma la activación de los linfocitos. De manera interesante, el aumento de CD25 es significativamente mayor en las células T CD8+ CD73KO al ser comparadas con las células WT (Fig10A-B). Además, se analizó la expresión de CD25 usando el inhibidor de CD73 (APCP) (Fig10C) en células activadas. Los resultados obtenidos nos muestran que al utilizar APCP en el cultivo aumenta significativamente la expresión de CD25 en las células T CD8+, semejante a lo que ocurre con las células CD73KO, lo que demuestra que la vía de señalización adenosinérgica es capaz de controlar la activación celular.

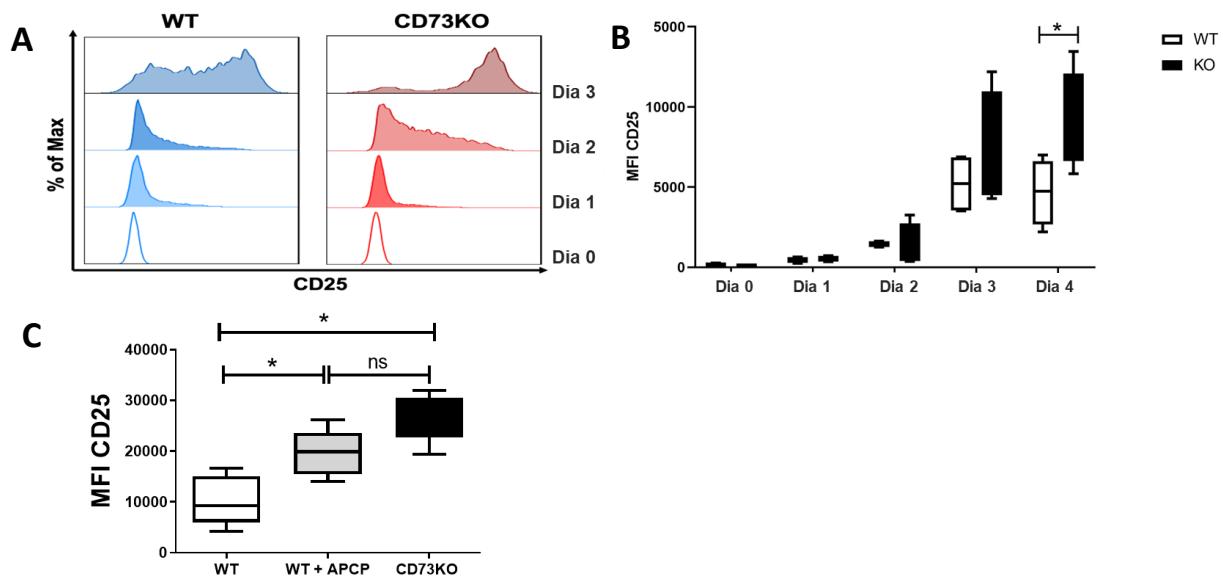


Figura 10. CD73 reduce la expresión de CD25 en células T CD8+ activadas *in vitro*. Se aislaron linfocitos T CD8+ vírgenes a partir de ratones WT y CD73KO. Luego se activaron *in vitro* con anticuerpos solubles α -CD3 y α -CD28 (1 ug/mL) durante 3-4 días en presencia de IL-2 (10 ng/mL). Se analizó la expresión de CD25 durante la activación de las células CD8 WT y CD73KO por citometría

de flujo. (A) Histograma representativo de la expresión de CD25 en células T CD8 WT y CD73KO por día, después de su activación *in vitro*. (B) Gráfico de la intensidad media de fluorescencia de CD25 de células WT y CD73KO por día después de la activación n=5. (C) Gráfico de la expresión de CD25 (MFI) en linfocitos T CD8+ WT, tratados con APCP (50 μ M) y linfocitos T CD8+ CD73KO luego de 3 días de activación *in vitro* n=5. Mann Whitney Test, *p < 0.05 (B). Kruskal-Wallis Test, *p < 0.05 (C).

6.6. CD73 AFECTA LA EXPRESIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN RELACIONADOS AL PROGRAMA EFECTOR DE CÉLULAS CD8+

Para estudiar en profundidad el rol de CD73 en la activación de las células T CD8+, se analizó la expresión de factores de transcripción relacionados con el programa efector como son *eomes*, *prdm1* (Blimp-1) y *tbx21* (T-bet) (Zhang and Bevan, 2011), además de los factores que están relacionados con el programa de memoria *lef1*, *tcf7* y *bcl-6* relacionados a la mantención de las células (Gattinoni et al., 2012).

Para esto se aislaron células T CD8+ vírgenes de ratones WT y CD73KO, y a partir de estas células se realizó la extracción de mRNA para realizar el PCR en tiempo real y obtener el punto inicial para comparar la expresión de los factores de transcripción. Además, células T CD8+ vírgenes se incubaron *in vitro* con α CD3/ α CD28 soluble en presencia de IL-2 por 3 días, para obtener linfocitos T CD8+ activados y realizar extracción del mRNA desde estas células.

Los resultados obtenidos nos indican que los factores de transcripción *lef1* y *tcf7* están regulados a la baja con respecto a las células vírgenes, tanto en las células T CD8+ de los ratones WT como de los ratones CD73KO (Fig11A-C). Para el factor transcripcional *bcl-6*, ambas células (WT y CD73KO) inducen su expresión después de la activación, sin diferencias significativas entre éstas (Fig11E). La expresión del factor de transcripción

eomes, relacionado con el fenotipo efector así como en la mantención de células de memoria (Pearce et al., 2003; Zhang and Bevan, 2011; Gattinoni et al., 2012) se reduce en las células WT y CD73KO luego de la activación (Fig11B), mientras que los factores de transcripción *tbx21* y *prdm1* se inducen luego de la activación (Fig11D-F). La expresión de *prdm1* en las células CD8+ activadas es similar en entre las células WT y CD73KO, mientras que las células CD73KO activadas muestran una tendencia a una mayor expresión del factor *tbx21*, lo que podría sugerir que CD73 es capaz de reducir la expresión de *tbx21*. Si bien se requiere un mayor número de réplicas experimentales, estos datos sugieren que CD73 podría limitar la adquisición del programa efector en linfocitos T CD8+.

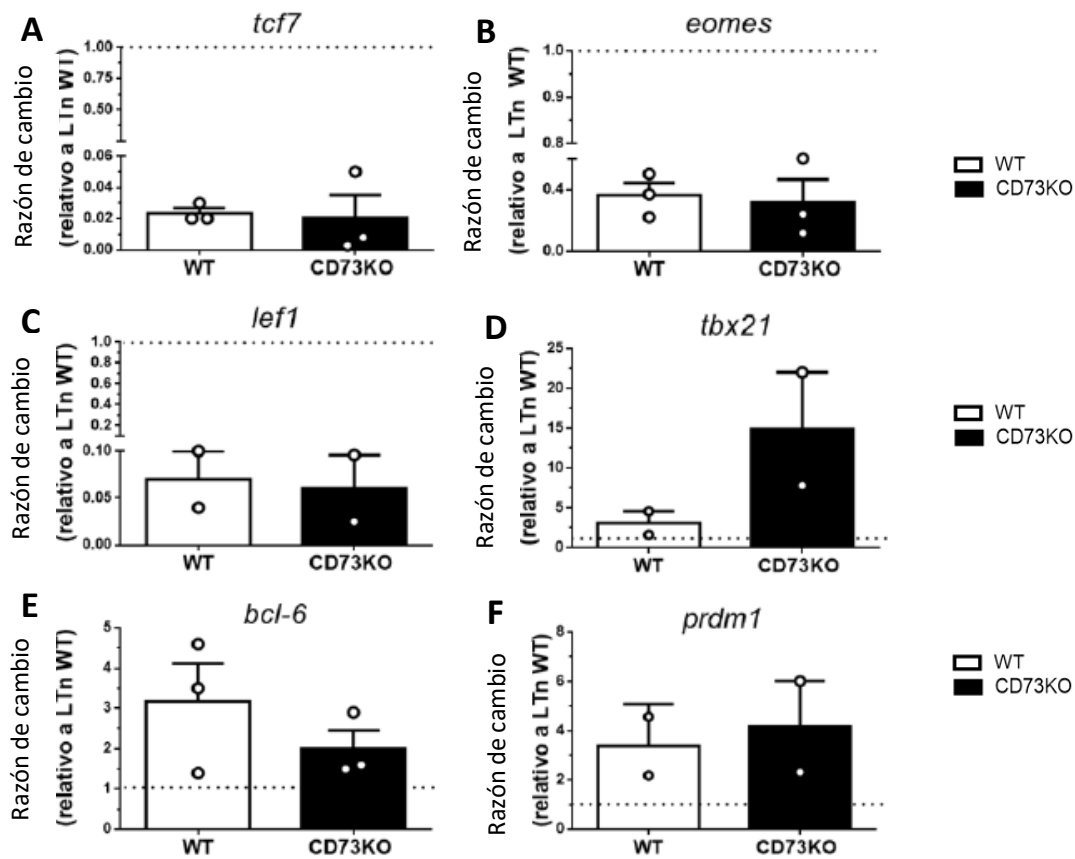


Figura 11. Evaluación de factores de transcripción maestros en linfocitos T CD8+ WT y CD73KO activados. Células T CD8 vírgenes WT y CD73KO fueron aisladas por cell sorting y luego fueron activados *in vitro* con anticuerpos solubles α -CD3 y α -CD28 (1 ug/mL) durante 3 días en presencia de IL-2 (10 ng/mL). Desde células vírgenes y activadas se realizó la extracción de mRNA y posterior PCR en tiempo real con los partidores específicos para cada gen. Los gráficos muestran la razón de cambio de los niveles de expresión mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, el cual compara los niveles de expresión de cada muestra con linfocitos T CD8+ vírgenes WT. La línea punteada representa la expresión de los linfocitos T CD8+ WT vírgenes. (A) Expresión relativa de *tcf7* en células CD8 WT y CD73KO. n=3 (B) Expresión relativa de *eomes* en células CD8 WT y CD73KO. n=3 (C) Expresión relativa de *lef1* en células CD8 WT y CD73KO. n=2 (D) Expresión relativa de *tbx21* en células CD8 WT y CD73KO. n=2 (E) Expresión relativa de *bcl-6* en células CD8 WT y CD73KO. n=3 (F) Expresión relativa de *prdm1* en células CD8 WT y CD73KO. n=2

6.7. CD73 REDUCE LA PRODUCCIÓN DE GRANZIMA B Y CITOQUINAS INFLAMATORIAS EN CÉLULAS T CD8+.

Los linfocitos T CD8+ son células encargadas de la lisis de células tumorales o infectadas por virus, por lo tanto, investigamos si CD73 afecta la capacidad efectora de estas células. Para esto, analizamos la expresión de citoquinas inflamatorias TNF- α e IFN- γ además de la producción de granzima B de células T CD8+ WT y CD73KO. Se aislaron células T CD8+ vírgenes para luego activarlas *in vitro* con anticuerpos solubles (α -CD3/CD28) en presencia de IL-2. Para observar las citoquinas las células se activaron con PMA e ionomicina en presencia de GolgiPlug por 4h antes de realizar un marcaje intracelular con anticuerpos específicos. El análisis se realizó por citometría de flujo.

El análisis de los resultados muestra una reducción en la producción de citoquinas mediada por CD73. En la figura 12A podemos observar que las células CD8+ CD73KO y células CD8 WT tratadas con el inhibidor enzimático de CD73 (APCP) presentan una mayor producción de IFN- γ y TNF- α que las células WT. Las células CD73KO mostraron una alta producción de las citoquinas estudiadas, en comparación con las células WT, similar a las

células tratadas con APCP. Todos esto nos indica que CD73 reduce la producción de citoquinas inflamatorias, aunque no se observa diferencias en la producción de IL-2.

Luego se analizó el porcentaje de células positivas para la producción de más de una citoquina en las células T CD8+ activadas. Se puede observar que las células CD73KO y linfocitos T CD8+ tratados con APCP, presentan una mayor producción simultánea de las citoquinas inflamatorias. En la Fig. 12B-C observamos un aumento significativo de la producción de TNF- α e IFN- γ en ausencia de CD73 o de su función enzimática. También observamos polifuncionalidad al analizar la producción de IFN- γ e IL-2, donde las células T CD8+ tratadas con APCP presentan una mayor producción simultánea de IFN- γ e IL-2 (Fig. 12D-E). Por otro lado, observamos que los linfocitos CD8+ CD73KO presentan una mayor producción de granzima B (Fig12E), lo que sugiere una mayor capacidad citotóxica de las células que no expresan CD73.

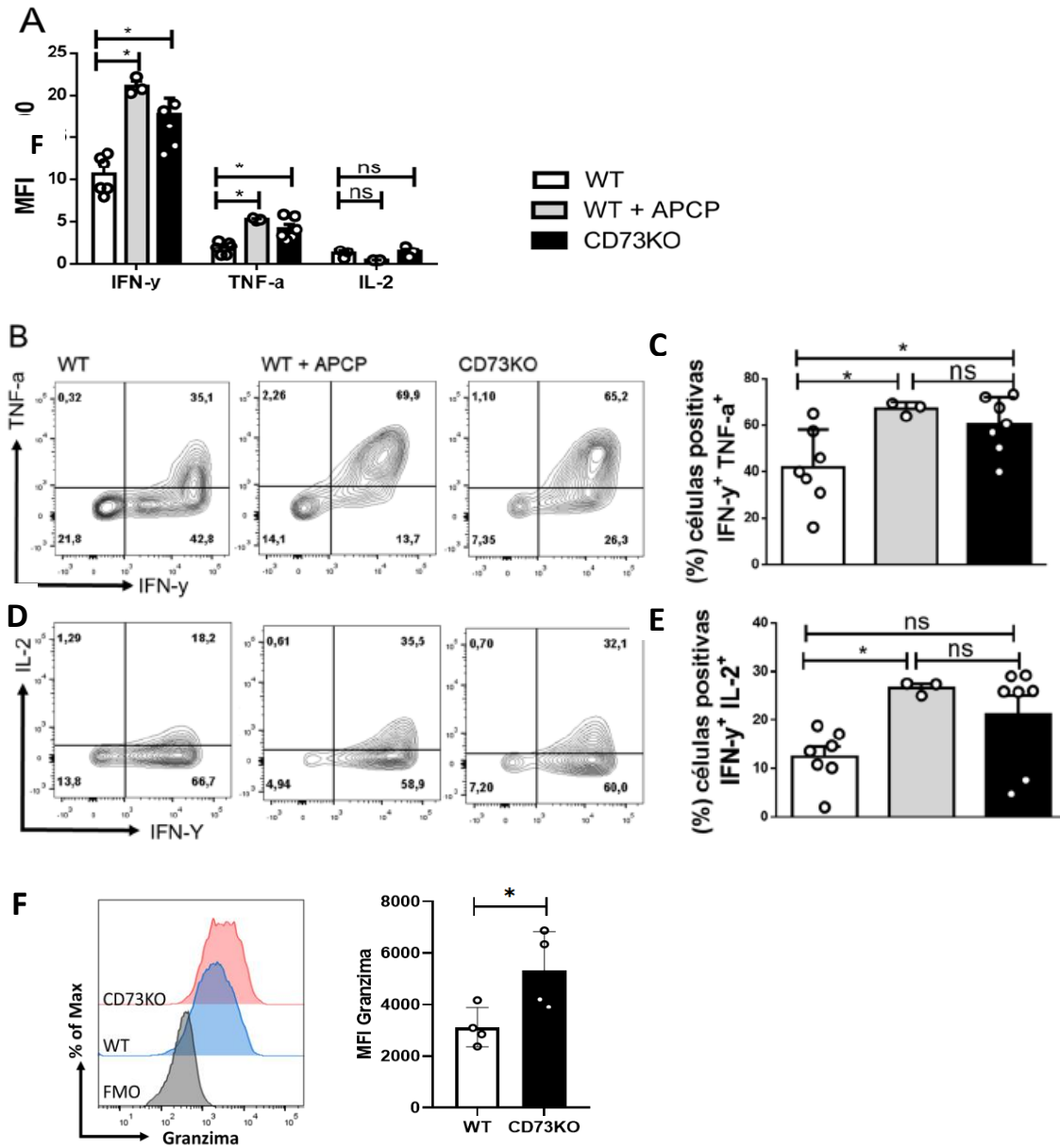


Figura 12. CD73 reduce la producción de granzima B y citoquinas inflamatorias en células T CD8+. Células aisladas a través de *cell sorting* fueron activadas *in vitro* con α CD3/ α CD28 soluble en presencia de IL-2 por 3 días. El análisis de granzima B se realiza a través de tinción intracelular por citometría de flujo. Para el análisis de citoquinas las células se reactivaron con PMA e ionomicina en presencia de GolgiPlug por 4 horas, y luego se analizó la producción de citoquinas mediante tinción intracelular por citometría de flujo. (A) Gráfico del MFI para las citoquinas IFN- γ , TNF y IL-2 en células CD8 WT, WT + APCP (50 μ M) y CD73KO n=6. (B) Gráfico de puntos representativos para las citoquinas IFN- γ , TNF. (C) Porcentaje de células T CD8+ positivas para los marcadores IFN- γ , TNF n=6. (D) Gráfico de puntos representativos para las citoquinas IFN- γ , IL-2. (E) Porcentaje de células WT y CD73KO CD8 positivas para los marcadores IFN- γ y IL-2 n=6. (F) Izquierda, Histograma de la expresión de granzima B en células T CD8+ WT y CD73KO activadas. Derecha, gráfico de la intensidad

de fluorescencia (MFI) de granzima n=4. Test de ANOVA y post hoc Bonferroni (A-E). Student t Test (E) *p < 0.05

7. DISCUSIÓN

CD73 es una ectonucleotidasa que hidroliza AMP a adenosina. Esta última, actúa como un potente inhibidor de la inflamación, a través de su receptor A2AR, logrando inhibir la activación de los linfocitos T. La supresión de la respuesta inmune provocada por la producción de adenosina por CD73, ha sido principalmente asociada a células inmunosupresoras como linfocitos T reguladores, células mieloides y células cancerosas (Deaglio et al., 2007; Stagg and Smyth, 2010; Ryzhov et al., 2011). En los últimos años se ha reportado que además de estas células, los linfocitos T CD4+ (Gourdin et al., 2018) y CD8+ efectores también expresan esta ectonucleotidasa (Flores-Santibáñez et al., 2015). Sin embargo, no existe más información sobre la expresión y función de CD73 durante la activación de los linfocitos T CD8+.

Se ha reportado que tanto células T CD8+ vírgenes, humanas y murinas, expresan altos niveles de CD73 (Dianzani et al., 1993; Flores-Santibáñez et al., 2015; Raczkowski et al., 2018). Interesantemente, Raczkowski et al. (2018) demuestran un alza transitoria de CD73 luego de la activación *in vitro* en células T CD8+ humanas. Sin embargo, durante la respuesta inmune, la expresión y el porcentaje de células CD8+ que expresan CD73 disminuye (Raczkowski et al., 2018). Relacionado a esto, diferentes trabajos han descrito poblaciones de linfocitos T efectores que en situaciones de estimulación crónica o pertenecientes a sitios inflamados, presentan una baja expresión CD73, como la artritis idiopática juvenil humana (Moncrieffe et al., 2010), en pacientes infectados con VIH (Tóth et al., 2013), en tumores (Gourdin et al., 2018) y leucemia (Kong et al., 2019) entre otros. Estos datos nos sugieren

que CD73 podría participar en el control de la activación durante la respuesta inmune, pero poco se conoce de su expresión y función durante el proceso de activación de los linfocitos T CD8+.

En este trabajo se evaluó la expresión de los componentes adenosinérgicos en linfocitos T CD8+ a medida que se desarrolla la respuesta inmune y se analizó la contribución de CD73 en la activación y diferenciación de los linfocitos citotóxicos. En conjunto, nuestros resultados demuestran que, durante la activación, las células T CD8+ aumentan la expresión de las ectonucleotidasas CD73 y CD39, del receptor de adenosina A2A y la producción de adenosina. Se sabe que adenosina tiene como función reducir la activación de los linfocitos, y los datos obtenidos en este trabajo sugieren que CD73 expresado en los linfocitos T CD8+ podría contribuir a controlar la activación del linfocito. En concordancia con lo anterior, nuestros resultados indican que la ausencia de CD73 en linfocitos T CD8+ se traduce en una mayor expresión de marcadores de activación, una mayor producción de citoquinas proinflamatorias y granzima B, y la inducción del programa efector en linfocitos T CD8+ una vez que han sido activados.

Los datos de este trabajo muestran que un alto porcentaje de células CD8+ vírgenes expresan CD73, por lo que esta ectonucleotidasa podría funcionar como un mecanismo de control de la activación celular frente a un estímulo antigénico. Por otro lado, trabajos de nuestro laboratorio han evaluado el rol de CD73 en la proliferación homeostática de las células CD8+ vírgenes, sugiriendo que CD73 promueve la supervivencia de estas células (Roseblatt et al., 2021). Ambos datos sugieren un modelo en el cual CD73 tiene un papel

dual en las células T CD8+. Cuando se encuentra en condiciones de estímulo antigénico, CD73 disminuye su capacidad efectora y, por otro lado, en condiciones homeostáticas de débil activación del TCR, la expresión de CD73 permite la supervivencia de las células T CD8+. Este efecto dual se vuelve relevante cuando se estudia a CD73 como un blanco en las terapias antitumorales, ya que el bloqueo de CD73 podría ser beneficiosa al aumentar la capacidad de las células T CD8+ efectoras, pero perjudicial para las células T CD8+ vírgenes durante la fase homeostática (Roseblatt et al., 2021).

Luego de la activación *in vitro* e *in vivo* de las células CD8+, la expresión de CD73 va en aumento hacia la fase efectora, así como también en la fase de memoria (Briceño et al., 2021). Las células efectoras presentarían la co-expresión de CD73 y CD39, alcanzando su punto máximo en el día 12 de la activación *in vivo* y en el día 4 de la activación *in vitro*. Además, las células CD8+ activadas (y vírgenes) fueron capaces de producir adenosina a partir de AMP, de manera dependiente de CD73. En conjunto, los datos sugieren que la expresión simultánea de CD39 y CD73 durante la fase efectora permite a las células T CD8+ producir adenosina a partir de ATP extracelular. Del mismo modo, no se descarta la posibilidad de producción de adenosina a partir de AMP por parte de las células T CD8+ vírgenes (Briceño et al., 2021).

Además de CD73 y CD39, un componente adenosinérgico relevante, es el receptor de adenosina A2A y nuestros resultados muestran que aumenta su expresión luego de la activación de las células T CD8+. Este receptor es el principal receptor de adenosina reportado en las células T relacionado con la inhibición de la activación (Huang et al., 1997;

Lappas et al., 2005; Sitkovsky and Ohta, 2005; Cekic et al., 2013). La estimulación del receptor A2A aumenta la producción de cAMP y activa la proteína quinasa A, actuando como un regulador negativo de la señalización dada por el TCR, restringiendo la activación de las células T (Vang et al., 2001; Linnemann et al., 2009; Linden and Cekic, 2012). En acuerdo con datos de la literatura (Ohta and Sitkovsky, 2001; Sitkovsky et al., 2004; Lappas et al., 2005; Sitkovsky and Ohta, 2005), nosotros observamos que tanto las células T CD8+ WT como las CD73KO aumentan la expresión proteica de A2AR con la activación y proliferación de las células CD8+ vírgenes, pero no logramos evidenciar el alza de la expresión génica en las células T CD8+ WT como lo evidencia Lappas et al., (2005). Esto puede deberse a la temporalidad de los análisis, ya que nosotros analizamos la expresión génica luego de 3 días de activación, mientras que Lappas et al. (2015) observa un aumento del transcrito de A2AR a las 4h posteriores a la activación para luego retornar a la línea basal a las 16h post activación. Interesantemente, las células T CD8+ CD73KO presentan un alza en la expresión génica de A2AR que no se corresponde con la expresión proteica, lo cual cuestiona los mecanismos de regulación de la expresión de A2AR, pero se presume que esta fuerte respuesta sería una regulación negativa para controlar la fuerte activación de las células T CD8+ CD73KO.

Un análisis más detallado de la señalización a través de A2AR muestra que el aumento de cAMP intracelular inhibe enzimas como PI3K, inhibiendo a Akt (Kim and Suresh, 2013) o la activación de otras como PKA (Allard et al., 2012; Cekic et al., 2013) lo que provoca la inhibición de ZAP-70 (Linnemann et al., 2009), interfiriendo con la señalización del TCR (Linnemann et al., 2009). Datos preliminares de nuestro laboratorio sugieren que las células

T CD8+ CD73KO presentan una menor cantidad de cAMP intracelular, por lo que la vía de señalización adenosinérgica estaría muy poco activa. Esto podría explicar los efectos de CD73 en la diferenciación y activación de las células T CD8+ al analizar posibles efectos de una terapia antitumoral de bloqueo de CD73. En consecuencia, sería interesante analizar la fosforilación de proteínas relevantes para la activación celular, como ZAP-70, ERK ½, PI3K y Akt, así como los niveles de cAMP intracelulares durante la activación y en presencia de diferentes inhibidores farmacológicos, para CD73 y A2AR, como los utilizados en este trabajo.

La ausencia CD73 provoca una mayor activación de las células T CD8+, al igual que lo observado cuando las células son carentes de A2AR (Lappas et al., 2005), lo que puede sugerir que el efecto de CD73 podría estar mediado por la activación del receptor de adenosina A2A. La activación de las células T CD8+ fue analizada a través de la expresión de la cadena alfa del receptor de la IL-2 o CD25, la cual se regula positivamente después de la estimulación del receptor de células T (Kalia et al., 2010). Su señalización induce factores de transcripción que promueven la diferenciación de las células T citotóxicas efectoras (Pipkin et al., 2010). Datos de la literatura indican que CD25 puede ser regulado negativamente por adenosina (Huang et al., 1997). En este trabajo se utilizó un inhibidor de la función enzimática de CD73, adenosin 5'-(α,β -metileno) difosfato (APCP), el cual es ampliamente utilizado como herramienta farmacológica para investigar el papel de la vía CD73-adenosina en varios modelos *in vitro* e *in vivo* (Allard et al., 2012; Allard et al., 2017; Caiazza et al., 2019). Nuestros datos muestran que las células T CD8+ CD73KO tienen una mayor expresión de CD25 que las células WT luego de ser activadas, observación que también ocurre con las

células que fueron tratadas con APCP. Estos datos sugieren que la activación de las células CD8+ es regulada por la adenosina producida por CD73 y la señalización por A2AR, apuntando a una regulación autocrina de las células CD8+. Así, CD73 podría regular la activación de los linfocitos T CD8+ después de una estimulación antigénica, lo cual se ve reflejado en una reducción en la expresión de CD25.

La diferenciación hacia células efectoras o células de memoria está regulado por el programa genético de la célula (Joshi et al., 2007; Zhang and Bevan, 2011). Los factores de transcripción *tcf-7* y *lef-1* se han relacionado con la autorrenovación en células T vírgenes o de memoria (Gattinoni et al., 2012), por lo que disminuyen al activar las células (Willinger et al., 2006; Hinrichs et al., 2008), siendo consistentes con nuestros resultados, donde las células presentan una baja expresión de estos factores de transcripción. Así también se analizó la expresión de *bcl-6*, factor transcripcional relacionado principalmente con la generación y mantención de células de memoria (Ichii et al., 2002). Sin embargo, nuestros datos muestran un aumento de expresión de este factor luego de la activación. Esto se puede explicar en base a los resultados de Yoshida et al. (2006) que demuestran que en células T CD8+ existe un aumento de la expresión del factor transcripcional *bcl-6* en etapas tempranas de activación (Yoshida et al., 2006).

Por otro lado, se analizaron factores transcripcionales relacionados con el programa efector, como *eomes*, *tbx21* y *pdrn1*. La expresión de *eomes*, se encuentra relacionado a los estados iniciales de la activación de células T CD8+ y coopera con T-bet en la inducción de expresión de proteínas citotóxicas como perforina y granzima B (Zhang and Bevan, 2011;

Gattinoni et al., 2012; McLane et al., 2013), además de participar en la mantención de células de memoria (Joshi et al., 2007; Banerjee et al., 2010). Sin embargo, no observamos en los tiempos analizados, un aumento en la expresión de este factor de transcripción, ni diferencias entre las células que presentan o no CD73. Luego se analizó la expresión de *tbx21* y *prdm1*, factores de transcripción que dirigen la diferenciación hacia células efectoras. Nuestros datos muestran que las células T CD8+ activadas aumentan la expresión de estos factores. Además, se puede observar que las células CD73KO presentan una tendencia a una mayor expresión de *tbx21* que las células T CD8+ WT. Estos resultados apuntan a que CD73 podría restringir la expresión de T-bet (proteína codificada por *tbx21*), lo que nos indica una menor producción de citoquinas inflamatorias en los linfocitos (Joshi et al., 2007) y menor actividad de mTOR disminuyendo el potencial de captación de nutrientes (Rao et al., 2010) .

La producción de citoquinas inflamatorias y granzima B es muy relevante en las células T CD8+ y puede ser afectada por la señalización adenosinérgica (Erdmann et al., 2005; Raskovalova et al., 2007; Mastelic-Gavillet et al., 2019). Trabajos de nuestro laboratorio analizaron la actividad antitumoral de células carentes de CD73 y se observó que estas células infiltran más al tumor y son más efectivas controlando el crecimiento tumoral que las células T CD8+ WT, por lo que la expresión de CD73 reduce la capacidad antitumoral (Briceño et al., 2021). Estos datos concuerdan con datos obtenidos en este trabajo, donde las células CD73KO estimuladas *in vitro* presentan mayor expresión de granzima B y citoquinas inflamatorias, además de producción simultánea de citoquinas lo que las hace más eficientes para la eliminación de células blanco. Esto significa que CD73 reduce el

potencial citotóxico de las células CD8+. Además, Briceño et al. (2021) analizaron la expresión de marcadores de agotamiento como son PD-1, TIM-3, CD39 y LAG-3 en las células T CD8+ infiltrantes de tumor, observando que CD73 favorece el fenotipo exhausto. Datos similares se han observado cuando es bloqueada la señalización por A2AR, donde disminuyen la expresión de PD-1 y LAG-3 (Leone et al., 2018), lo cual sugiere que es la adenosina producida por CD73 en el linfocito T CD8+, es un factor importante en el agotamiento celular.

Tal como trabajos describen el efecto de adenosina inhibiendo la fosforilación de ZAP-70, ERK1/2, AKT (Linnemann et al., 2009) esperamos que el efecto de CD73, siendo el productor de adenosina, comprometa las mismas vías de señalización. El efecto sobre estas moléculas provoca una inhibición en los factores de transcripción involucrados en las funciones efectoras, de diferenciación, supervivencia y proliferación de las células T CD8, como son NFAT, Fos, Jun y NFκB (Hwang et al., 2020). La inhibición de la fosforilación de ZAP-70 y Lck inhibe vías como MAP Kinasas con ERK1/2 que lleva a la activación de proteína activadora 1 (AP-1) y la vía de la fosfolipasa C (PLC) e IP3 que lleva al aumento de Ca²⁺ intracelular y finalmente a la activación de NFAT. AP-1 es un complejo dimérico cuyos componentes principales son los factores de transcripción Fos y Jun (Papavassiliou and Musti, 2020), que en conjunto con NFAT inducen la expresión de IL-2, IFN-γ y otras citoquinas (Rooney et al., 1995; Macián et al., 2000; Kaminuma et al., 2002). Otros trabajos han relacionado a NFAT con la transcripción de genes como *Tbx21* y *Gzmb*, que expresan las proteínas T-bet y granzima B, respectivamente (Klein-Hessling et al., 2017). Además, NFAT estaría relacionado con el agotamiento celular en estimulaciones crónicas, en

ausencia de otros factores como Jun (Martinez et al., 2015). Por otro lado, la inhibición que provoca el aumento de cAMP también inhibe la activación de PI3K, lo que lleva a la inhibición de PDK1 (Kim and Suresh, 2013) interfiriendo en la activación de NFκB. (Hwang et al., 2020). El factor de transcripción NFκB está relacionado con la supervivencia celular, con funciones anti apoptóticas y de proliferación (Gerondakis and Siebenlist, 2010). Dilucidar que vía se encuentra más afectada por la adenosina producida por CD73, serán los próximos desafíos que plantea este trabajo, ya que podemos inferir que estas vías son afectadas por CD73. La regulación de la expresión transcripcional cambia en la medida que las células se están activando, en la variación de la abundancia de proteínas y con ello la formación de distintos complejos proteicos, que tienen diferentes consecuencias en la célula (Papavassiliou and Musti, 2020).

En conjunto los datos en nuestro trabajo nos permiten tener una idea general del efecto de la producción de adenosina por CD73, donde la señalización adenosinérgica está presente durante la diferenciación de las células T CD8+ vírgenes a células citotóxicas. CD73 participa en la regulación de la activación de las células T CD8+, como un punto de control, para frenar la sobre activación de las células inmunes inhibiendo el programa efector de las células, lo que se traduce en menor expresión de CD25, menor producción de citoquinas y granzima B. Estos datos sugieren a CD73 como blanco terapéutico para terapias antitumorales, donde el foco sea inhibir la producción de adenosina, con el fin de potenciar la actividad efectora de las células CD8+.

8. CONCLUSIONES

La suma de nuestros resultados demuestra que CD73 se encuentra presente y funcional en las células CD8+ vírgenes y aumenta su expresión a medida que las células se activan. Las células activadas también expresan el principal receptor de adenosina A2AR, lo cual indica que los linfocitos T CD8+ poseen los componentes necesarios para la señalización adenosinérgica. Más aún, demostramos que CD73 reduce la activación de los linfocitos T CD8+, su programa efector y su capacidad citotóxica. De esta forma concluimos que la producción de adenosina mediada por CD73 limita la diferenciación y activación de los linfocitos T CD8+, por lo cual postulamos que esta enzima puede ser considerada como un mecanismo de control de la activación linfocitaria.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Allard, B., Longhi, M.S., Robson, S.C., and Stagg, J. (2017). The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol Rev* 276(1), 121-144. doi: 10.1111/imr.12528.
- Allard, B., Turcotte, M., and Stagg, J. (2012). CD73-generated adenosine: orchestrating the tumor-stroma interplay to promote cancer growth. *J Biomed Biotechnol* 2012, 485156. doi: 10.1155/2012/485156.
- Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E.S., and Haskó, G. (2013). CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med* 19(6), 355-367. doi: 10.1016/j.molmed.2013.03.005.
- Baaten, B.J., Li, C.R., and Bradley, L.M. (2010). Multifaceted regulation of T cells by CD44. *Commun Integr Biol* 3(6), 508-512. doi: 10.4161/cib.3.6.13495.
- Banerjee, A., Gordon, S.M., Intlekofer, A.M., Paley, M.A., Mooney, E.C., Lindsten, T., et al. (2010). Cutting edge: The transcription factor eomesodermin enables CD8⁺ T cells to compete for the memory cell niche. *J Immunol* 185(9), 4988-4992. doi: 10.4049/jimmunol.1002042.
- Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., et al. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439(7077), 682-687. doi: 10.1038/nature04444.
- Bono, M.R., Elgueta, R., Sauma, D., Pino, K., Osorio, F., Michea, P., et al. (2007). The essential role of chemokines in the selective regulation of lymphocyte homing. *Cytokine Growth Factor Rev* 18(1-2), 33-43. doi: 10.1016/j.cytogfr.2007.01.004.
- Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., et al. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110(4), 1225-1232. doi: 10.1182/blood-2006-12-064527.
- Bours, M.J., Swennen, E.L., Di Virgilio, F., Cronstein, B.N., and Dagnelie, P.C. (2006). Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 112(2), 358-404. doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.04.013.
- Briceño, P., Rivas-Yañez, E., Roseblatt, M.V., Parra-Tello, B., Farías, P., Vargas, L., et al. (2021). CD73 Ectonucleotidase Restrains CD8⁺ T Cell Metabolic Fitness and Anti-tumoral Activity. *9(185)*. doi: 10.3389/fcell.2021.638037.
- Caiazzo, E., Morello, S., Carnuccio, R., Ialenti, A., and Cicala, C. (2019). The Ecto-5'-Nucleotidase/CD73 Inhibitor, α,β -Methylene Adenosine 5'-Diphosphate, Exacerbates Carrageenan-Induced Pleurisy in Rat. *10(775)*. doi: 10.3389/fphar.2019.00775.
- Cartwright, E.K., Spicer, L., Smith, S.A., Lee, D., Fast, R., Paganini, S., et al. (2016). CD8(+) Lymphocytes Are Required for Maintaining Viral Suppression in SIV-Infected Macaques Treated with Short-Term Antiretroviral Therapy. *Immunity* 45(3), 656-668. doi: 10.1016/j.immuni.2016.08.018.
- Cekic, C., and Linden, J. (2016). Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 16(3), 177-192. doi: 10.1038/nri.2016.4.
- Cekic, C., Sag, D., Day, Y.-J., and Linden, J. (2013). Extracellular adenosine regulates naive T cell development and peripheral maintenance. *Journal of Experimental Medicine* 210(12), 2693-2706. doi: 10.1084/jem.20130249 %J Journal of Experimental Medicine.
- Chang, J.T., Wherry, E.J., and Goldrath, A.W. (2014). Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nat Immunol* 15(12), 1104-1115. doi: 10.1038/ni.3031.
- Csóka, B., Himer, L., Selmeczy, Z., Vizi, E.S., Pacher, P., Ledent, C., et al. (2008). Adenosine A2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. *Faseb j* 22(10), 3491-3499. doi: 10.1096/fj.08-107458.

- Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., et al. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204(6), 1257-1265. doi: 10.1084/jem.20062512.
- Di Virgilio, F., and Adinolfi, E. (2017). Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene* 36(3), 293-303. doi: 10.1038/onc.2016.206.
- Di Virgilio, F., Sarti, A.C., Falzoni, S., De Marchi, E., and Adinolfi, E. (2018). Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Cancer* 18(10), 601-618. doi: 10.1038/s41568-018-0037-0.
- Di Virgilio, F., and Vuerich, M. (2015). Purinergic signaling in the immune system. *Auton Neurosci* 191, 117-123. doi: 10.1016/j.autneu.2015.04.011.
- Dianzani, U., Redoglia, V., Bragardo, M., Attisano, C., Bianchi, A., Di Franco, D., et al. (1993). Costimulatory signal delivered by CD73 molecule to human CD45RAhiCD45ROlo (naive) CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* 151(8), 3961-3970.
- Dudley, M.E., Yang, J.C., Sherry, R., Hughes, M.S., Royal, R., Kammula, U., et al. (2008). Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol* 26(32), 5233-5239. doi: 10.1200/jco.2008.16.5449.
- Dumontet, C., Peyrottes, S., Rabeson, C., Cros-Perrial, E., Géant, P.Y., Chaloin, L., et al. (2018). CD73 inhibition by purine cytotoxic nucleoside analogue-based diphosphonates. *European Journal of Medicinal Chemistry* 157, 1051-1055. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.035>.
- Eltzschig, H.K., Sitkovsky, M.V., and Robson, S.C. (2012). Purinergic signaling during inflammation. *N Engl J Med* 367(24), 2322-2333. doi: 10.1056/NEJMr1205750.
- Erdmann, A.A., Gao, Z.-G., Jung, U., Foley, J., Borenstein, T., Jacobson, K.A., et al. (2005). Activation of Th1 and Tc1 cell adenosine A2A receptors directly inhibits IL-2 secretion in vitro and IL-2-driven expansion in vivo. *Blood* 105(12), 4707-4714. doi: 10.1182/blood-2004-04-1407 %J Blood.
- Flores-Santibáñez, F., Fernández, D., Meza, D., Tejón, G., Vargas, L., Varela-Nallar, L., et al. (2015). CD73-mediated adenosine production promotes stem cell-like properties in mouse Tc17 cells. *Immunology* 146(4), 582-594. doi: 10.1111/imm.12529.
- Gattinoni, L., Klebanoff, C.A., and Restifo, N.P. (2012). Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat Rev Cancer* 12(10), 671-684. doi: 10.1038/nrc3322.
- Gerlach, C., van Heijst, J.W., Swart, E., Sie, D., Armstrong, N., Kerkhoven, R.M., et al. (2010). One naive T cell, multiple fates in CD8+ T cell differentiation. *J Exp Med* 207(6), 1235-1246. doi: 10.1084/jem.20091175.
- Gerondakis, S., and Siebenlist, U. (2010). Roles of the NF-kappaB pathway in lymphocyte development and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(5), a000182. doi: 10.1101/cshperspect.a000182.
- Gourdin, N., Bossennec, M., Rodriguez, C., Vigano, S., Machon, C., Jandus, C., et al. (2018). Autocrine Adenosine Regulates Tumor Polyfunctional CD73(+)CD4(+) Effector T Cells Devoid of Immune Checkpoints. *Cancer Res* 78(13), 3604-3618. doi: 10.1158/0008-5472.Can-17-2405.
- Hamann, D., Baars, P.A., Rep, M.H., Hooibrink, B., Kerkhof-Garde, S.R., Klein, M.R., et al. (1997). Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med* 186(9), 1407-1418. doi: 10.1084/jem.186.9.1407.
- Hinrichs, C.S., Borman, Z.A., Cassard, L., Gattinoni, L., Spolski, R., Yu, Z., et al. (2009). Adoptively transferred effector cells derived from naive rather than central memory CD8+ T cells

- mediate superior antitumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(41), 17469-17474. doi: 10.1073/pnas.0907448106.
- Hinrichs, C.S., Spolski, R., Paulos, C.M., Gattinoni, L., Kerstann, K.W., Palmer, D.C., et al. (2008). IL-2 and IL-21 confer opposing differentiation programs to CD8+ T cells for adoptive immunotherapy. *Blood* 111(11), 5326-5333. doi: 10.1182/blood-2007-09-113050.
- Huang, S., Apasov, S., Koshiba, M., and Sitkovsky, M. (1997). Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. *Blood* 90(4), 1600-1610.
- Hwang, J.-R., Byeon, Y., Kim, D., and Park, S.-G. (2020). Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Experimental & Molecular Medicine* 52(5), 750-761. doi: 10.1038/s12276-020-0435-8.
- Ichii, H., Sakamoto, A., Hatano, M., Okada, S., Toyama, H., Taki, S., et al. (2002). Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8+ T cells. *Nat Immunol* 3(6), 558-563. doi: 10.1038/ni802.
- Joshi, N.S., Cui, W., Chandele, A., Lee, H.K., Urso, D.R., Hageman, J., et al. (2007). Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* 27(2), 281-295. doi: 10.1016/j.immuni.2007.07.010.
- Junger, W.G. (2011). Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol* 11(3), 201-212. doi: 10.1038/nri2938.
- Kaech, S.M., and Cui, W. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 12(11), 749-761. doi: 10.1038/nri3307.
- Kalia, V., Sarkar, S., Subramaniam, S., Haining, W.N., Smith, K.A., and Ahmed, R. (2010). Prolonged interleukin-2R α expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity* 32(1), 91-103. doi: 10.1016/j.immuni.2009.11.010.
- Kaminuma, O., Elly, C., Tanaka, Y., Mori, A., Liu, Y.C., Altman, A., et al. (2002). Vav-induced activation of the human IFN-gamma gene promoter is mediated by upregulation of AP-1 activity. *FEBS Lett* 514(2-3), 153-158. doi: 10.1016/s0014-5793(02)02316-5.
- Kim, E.H., and Suresh, M. (2013). Role of PI3K/Akt signaling in memory CD8 T cell differentiation. *Front Immunol* 4, 20. doi: 10.3389/fimmu.2013.00020.
- Klein-Hessling, S., Muhammad, K., Klein, M., Pusch, T., Rudolf, R., Flöter, J., et al. (2017). NFATc1 controls the cytotoxicity of CD8+ T cells. *Nature Communications* 8(1), 511. doi: 10.1038/s41467-017-00612-6.
- Kobie, J.J., Shah, P.R., Yang, L., Rebhahn, J.A., Fowell, D.J., and Mosmann, T.R. (2006). T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol* 177(10), 6780-6786. doi: 10.4049/jimmunol.177.10.6780.
- Kong, Y., Jia, B., Zhao, C., Claxton, D.F., Sharma, A., Annageldiyev, C., et al. (2019). Downregulation of CD73 associates with T cell exhaustion in AML patients. *J Hematol Oncol* 12(1), 40. doi: 10.1186/s13045-019-0728-3.
- Lappas, C.M., Rieger, J.M., and Linden, J. (2005). A2A Adenosine Receptor Induction Inhibits IFN- γ Production in Murine CD4+T Cells. 174(2), 1073-1080. doi: 10.4049/jimmunol.174.2.1073
- Leone, R.D., Sun, I.-M., Oh, M.-H., Sun, I.-H., Wen, J., Englert, J., et al. (2018). Inhibition of the adenosine A2a receptor modulates expression of T cell coinhibitory receptors and improves effector function for enhanced checkpoint blockade and ACT in murine cancer models. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 67(8), 1271-1284. doi: 10.1007/s00262-018-2186-0.

- Li, J., Wang, L., Chen, X., Li, L., Li, Y., Ping, Y., et al. (2017). CD39/CD73 upregulation on myeloid-derived suppressor cells via TGF- β -mTOR-HIF-1 signaling in patients with non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* 6(6), e1320011. doi: 10.1080/2162402x.2017.1320011.
- Linden, J., and Cekic, C. (2012). Regulation of lymphocyte function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(9), 2097-2103. doi: 10.1161/atvbaha.111.226837.
- Linnemann, C., Schildberg, F.A., Schurich, A., Diehl, L., Hegenbarth, S.I., Endl, E., et al. (2009). Adenosine regulates CD8 T-cell priming by inhibition of membrane-proximal T-cell receptor signalling. *Immunology* 128(1 Suppl), e728-737. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03075.x.
- Macián, F., García-Rodríguez, C., and Rao, A. (2000). Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. *Embo j* 19(17), 4783-4795. doi: 10.1093/emboj/19.17.4783.
- Martinez, G.J., Pereira, R.M., Äijö, T., Kim, E.Y., Marangoni, F., Pipkin, M.E., et al. (2015). The transcription factor NFAT promotes exhaustion of activated CD8⁺ T cells. *Immunity* 42(2), 265-278. doi: 10.1016/j.immuni.2015.01.006.
- Mastelic-Gavillet, B., Navarro Rodrigo, B., Décombaz, L., Wang, H., Ercolano, G., Ahmed, R., et al. (2019). Adenosine mediates functional and metabolic suppression of peripheral and tumor-infiltrating CD8⁺ T cells. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 7(1), 257. doi: 10.1186/s40425-019-0719-5.
- McLane, L.M., Banerjee, P.P., Cosma, G.L., Makedonas, G., Wherry, E.J., Orange, J.S., et al. (2013). Differential localization of T-bet and Eomes in CD8 T cell memory populations. *J Immunol* 190(7), 3207-3215. doi: 10.4049/jimmunol.1201556.
- Moncrieffe, H., Nistala, K., Kamhieh, Y., Evans, J., Eddaoudi, A., Eaton, S., et al. (2010). High expression of the ectonucleotidase CD39 on T cells from the inflamed site identifies two distinct populations, one regulatory and one memory T cell population. *J Immunol* 185(1), 134-143. doi: 10.4049/jimmunol.0803474.
- Morciano, G., Sarti, A.C., Marchi, S., Missiroli, S., Falzoni, S., Raffaghello, L., et al. (2017). Use of luciferase probes to measure ATP in living cells and animals. *Nat Protoc* 12(8), 1542-1562. doi: 10.1038/nprot.2017.052.
- Obar, J.J., Molloy, M.J., Jellison, E.R., Stoklasek, T.A., Zhang, W., Usherwood, E.J., et al. (2010). CD4⁺ T cell regulation of CD25 expression controls development of short-lived effector CD8⁺ T cells in primary and secondary responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(1), 193-198. doi: 10.1073/pnas.0909945107.
- Ohta, A., Kini, R., Ohta, A., Subramanian, M., Madasu, M., and Sitkovsky, M. (2012). The development and immunosuppressive functions of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway. *Front Immunol* 3, 190. doi: 10.3389/fimmu.2012.00190.
- Ohta, A., Ohta, A., Madasu, M., Kini, R., Subramanian, M., Goel, N., et al. (2009). A2A adenosine receptor may allow expansion of T cells lacking effector functions in extracellular adenosine-rich microenvironments. *J Immunol* 183(9), 5487-5493. doi: 10.4049/jimmunol.0901247.
- Ohta, A., and Sitkovsky, M. (2001). Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 414(6866), 916-920. doi: 10.1038/414916a.
- Papavassiliou, A.G., and Musti, A.M. (2020). The Multifaceted Output of c-Jun Biological Activity: Focus at the Junction of CD8 T Cell Activation and Exhaustion. *Cells* 9(11). doi: 10.3390/cells9112470.

- Pearce, E.L., Mullen, A.C., Martins, G.A., Krawczyk, C.M., Hutchins, A.S., Zediak, V.P., et al. (2003). Control of effector CD8⁺ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science* 302(5647), 1041-1043. doi: 10.1126/science.1090148.
- Pellegatti, P., Raffaghello, L., Bianchi, G., Piccardi, F., Pistoia, V., and Di Virgilio, F. (2008). Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One* 3(7), e2599. doi: 10.1371/journal.pone.0002599.
- Pipkin, M.E., Sacks, J.A., Cruz-Guilloty, F., Lichtenheld, M.G., Bevan, M.J., and Rao, A. (2010). Interleukin-2 and Inflammation Induce Distinct Transcriptional Programs that Promote the Differentiation of Effector Cytolytic T Cells. *Immunity* 32(1), 79-90. doi: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.012>.
- Raczkowski, F., Rissiek, A., Ricklefs, I., Heiss, K., Schumacher, V., Wundenberg, K., et al. (2018). CD39 is upregulated during activation of mouse and human T cells and attenuates the immune response to *Listeria monocytogenes*. *PLoS One* 13(5), e0197151. doi: 10.1371/journal.pone.0197151.
- Rao, R.R., Li, Q., Odunsi, K., and Shrikant, P.A. (2010). The mTOR kinase determines effector versus memory CD8⁺ T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin. *Immunity* 32(1), 67-78. doi: 10.1016/j.immuni.2009.10.010.
- Raskovalova, T., Lokshin, A., Huang, X., Su, Y., Mandic, M., Zarour, H.M., et al. (2007). Inhibition of Cytokine Production and Cytotoxic Activity of Human Antimelanoma Specific CD8⁺ and CD4⁺ T Lymphocytes by Adenosine-Protein Kinase A Type I Signaling. 67(12), 5949-5956. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4249 %J Cancer Research.
- Regateiro, F.S., Cobbold, S.P., and Waldmann, H. (2013). CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. *Clin Exp Immunol* 171(1), 1-7. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04623.x.
- Remmerswaal, E.B.M., Hombrink, P., Nota, B., Pircher, H., Ten Berge, I.J.M., van Lier, R.A.W., et al. (2019). Expression of IL-7R α and KLRG1 defines functionally distinct CD8⁺ T-cell populations in humans. *Eur J Immunol* 49(5), 694-708. doi: 10.1002/eji.201847897.
- Resta, R., Yamashita, Y., and Thompson, L.F. (1998). Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev* 161, 95-109. doi: 10.1111/j.1600-065x.1998.tb01574.x.
- Rivas-Yáñez, E., Barrera-Avalos, C., Parra-Tello, B., Briceño, P., Roseblatt, M.V., Saavedra-Almarza, J., et al. (2020). P2X7 Receptor at the Crossroads of T Cell Fate. *Int J Mol Sci* 21(14). doi: 10.3390/ijms21144937.
- Robson, S.C., Sévigny, J., and Zimmermann, H. (2006). The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2(2), 409-430. doi: 10.1007/s11302-006-9003-5.
- Rooney, J.W., Sun, Y.L., Glimcher, L.H., and Hoey, T. (1995). Novel NFAT sites that mediate activation of the interleukin-2 promoter in response to T-cell receptor stimulation. 15(11), 6299-6310. doi: doi:10.1128/MCB.15.11.6299.
- Roseblatt, M.V., Parra-Tello, B., Briceño, P., Rivas-Yáñez, E., Tucer, S., Saavedra-Almarza, J., et al. (2021). Ecto-5' -Nucleotidase (CD73) Regulates the Survival of CD8⁺ T Cells. 9(766). doi: 10.3389/fcell.2021.647058.
- Rossy, J., Williamson, D., and Gaus, K. (2012). How does the kinase Lck phosphorylate the T cell receptor? Spatial organization as a regulatory mechanism. 3(167). doi: 10.3389/fimmu.2012.00167.

- Ryzhov, S., Novitskiy, S.V., Goldstein, A.E., Biktasova, A., Blackburn, M.R., Biaggioni, I., et al. (2011). Adenosinergic regulation of the expansion and immunosuppressive activity of CD11b+Gr1+ cells. *J Immunol* 187(11), 6120-6129. doi: 10.4049/jimmunol.1101225.
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401(6754), 708-712. doi: 10.1038/44385.
- Schenk, U., Westendorf, A.M., Radaelli, E., Casati, A., Ferro, M., Fumagalli, M., et al. (2008). Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci Signal* 1(39), ra6. doi: 10.1126/scisignal.1160583.
- Sitkovsky, M.V., Lukashev, D., Apasov, S., Kojima, H., Koshiba, M., Caldwell, C., et al. (2004). Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annu Rev Immunol* 22, 657-682. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104731.
- Sitkovsky, M.V., and Ohta, A. (2005). The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? *Trends Immunol* 26(6), 299-304. doi: 10.1016/j.it.2005.04.004.
- Stagg, J., and Smyth, M.J. (2010). Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene* 29(39), 5346-5358. doi: 10.1038/onc.2010.292.
- Sukumar, M., Liu, J., Ji, Y., Subramanian, M., Crompton, J.G., Yu, Z., et al. (2013). Inhibiting glycolytic metabolism enhances CD8+ T cell memory and antitumor function. *J Clin Invest* 123(10), 4479-4488. doi: 10.1172/jci69589.
- Tóth, I., Le, A.Q., Hartjen, P., Thomssen, A., Matzat, V., Lehmann, C., et al. (2013). Decreased frequency of CD73+CD8+ T cells of HIV-infected patients correlates with immune activation and T cell exhaustion. *J Leukoc Biol* 94(4), 551-561. doi: 10.1189/jlb.0113018.
- Vang, T., Torgersen, K.M., Sundvold, V., Saxena, M., Levy, F.O., Skålhegg, B.S., et al. (2001). Activation of the C-terminal Src Kinase (Csk) by Camp-Dependent Protein Kinase Inhibits Signaling through the T Cell Receptor. *Journal of Experimental Medicine* 193(4), 497-508. doi: 10.1084/jem.193.4.497 %J Journal of Experimental Medicine.
- Willinger, T., Freeman, T., Herbert, M., Hasegawa, H., McMichael, A.J., and Callan, M.F. (2006). Human naive CD8 T cells down-regulate expression of the WNT pathway transcription factors lymphoid enhancer binding factor 1 and transcription factor 7 (T cell factor-1) following antigen encounter in vitro and in vivo. *J Immunol* 176(3), 1439-1446. doi: 10.4049/jimmunol.176.3.1439.
- Yang, S., Liu, F., Wang, Q.J., Rosenberg, S.A., and Morgan, R.A. (2011). The shedding of CD62L (L-selectin) regulates the acquisition of lytic activity in human tumor reactive T lymphocytes. *PLoS One* 6(7), e22560. doi: 10.1371/journal.pone.0022560.
- Yao, S.Y., Ng, A.M., Cass, C.E., Baldwin, S.A., and Young, J.D. (2011). Nucleobase transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1). *J Biol Chem* 286(37), 32552-32562. doi: 10.1074/jbc.M111.236117.
- Yoshida, K., Sakamoto, A., Yamashita, K., Arguni, E., Horigome, S., Arima, M., et al. (2006). Bcl6 controls granzyme B expression in effector CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 36(12), 3146-3156. doi: 10.1002/eji.200636165.
- Zarek, P.E., Huang, C.T., Lutz, E.R., Kowalski, J., Horton, M.R., Linden, J., et al. (2008). A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* 111(1), 251-259. doi: 10.1182/blood-2007-03-081646.
- Zhang, N., and Bevan, M.J. (2011). CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* 35(2), 161-168. doi: 10.1016/j.immuni.2011.07.010.

Zhao, Y., Wang, Q.J., Yang, S., Kochenderfer, J.N., Zheng, Z., Zhong, X., et al. (2009). A herceptin-based chimeric antigen receptor with modified signaling domains leads to enhanced survival of transduced T lymphocytes and antitumor activity. *J Immunol* 183(9), 5563-5574. doi: 10.4049/jimmunol.0900447.